

# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

par

**Claude GILLONNIER**

Ingénieur Chimiste E.S.C.I.L.

Licencié ès-Sciences

---

Première Thèse

**SYNTHÈSE DE QUELQUES PEPTIDES  
ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA BRADYKININE**

---

Deuxième Thèse

**PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ**

---

Soutenue le 6 Juillet 1966 devant la Commission d'Examen

MM. J. COLONGE    Président

J. CHOPIN

G. MICHEL

E. BRICAS

} Membres du Jury

Membre invité

EDITIONS DE L'A.G.E.L.

20, Rue François-Garcin — LYON (3°)

1966







# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

par

**Claude GILLONNIER**

Ingénieur Chimiste E.S.C.I.L.

Licencié ès-Sciences

---

Première Thèse

SYNTHÈSE DE QUELQUES PEPTIDES  
ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA BRADYKININE

---

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

---

Soutenue le 6 Juillet 1966 devant la Commission d'Examen

MM. J. COLONGE    Président

J. CHOPIN

G. MICHEL

E. BRICAS

} Membres du Jury

Membre invité

EDITIONS DE L'A.G.E.L.

20, Rue François-Garcin — LYON (3<sup>e</sup>)

1966

# THESES

THESE  
DE  
MATHÉMATIQUES

PAR  
M. J. L. VAN DER  
WOUDE



ANNALES DE MATHÉMATIQUES  
PUBLIÉES PAR LA FACULTÉ

PROPOSITIONS COMPOSÉES PAR LA FACULTÉ

PAR  
M. J. L. VAN DER  
WOUDE  
MATHÉMATIQUES  
MATHÉMATIQUES  
MATHÉMATIQUES

PAR  
M. J. L. VAN DER  
WOUDE

DOYENS HONORAIRES

MM.LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD,  
EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET.

DOYEN

M.BRACONNI ER

ASSESSEURS

MM.MESNARD , BOIDIN

PROFESSEURS

|                |                                    |
|----------------|------------------------------------|
| MM LONGCHAMBON | Minéralogie                        |
| PRETTRE        | Chimie industrielle                |
| COURTY         | Chimie-Physique                    |
| KUHNER         | Botanique                          |
| MALECOT        | Mécanique rationnelle et appliquée |
| PARIS          | Chimie minérale                    |
| AUMERAS        | Chimie générale II                 |
| COLONGE        | Chimie organique                   |
| JANIN          | Physique générale                  |
| FLANDRIN       | Géologie appliquée                 |
| BERNARD        | Physique industrielle              |
| DUFAY Jean     | Astronomie                         |
| NIGON          | Zoologie expérimentale             |
| GAUTHIER Henri | Géologie générale                  |
| WAUTIER        | Zoologie                           |
| CHOPIN         | Chimie biologique                  |
| CUEILLERON     | Chimie                             |
| BRACONNIER     | Calcul différentiel et intégral    |
| EYRAUD Charles | Chimie-Physique appliquée          |
| SARAZIN        | Physique nucléaire                 |
| BOIDIN         | Microbiologie et Mycologie         |
| PERES          | Physiologie                        |
| MESNARD        | Electronique                       |
| GRANDMONTAGNE  | Physique                           |
| BOUTILLIER     | Minéralogie                        |
| LAFOUCRIERE    | Physique nucléaire théorique       |
| DREUX          | Chimie organique                   |



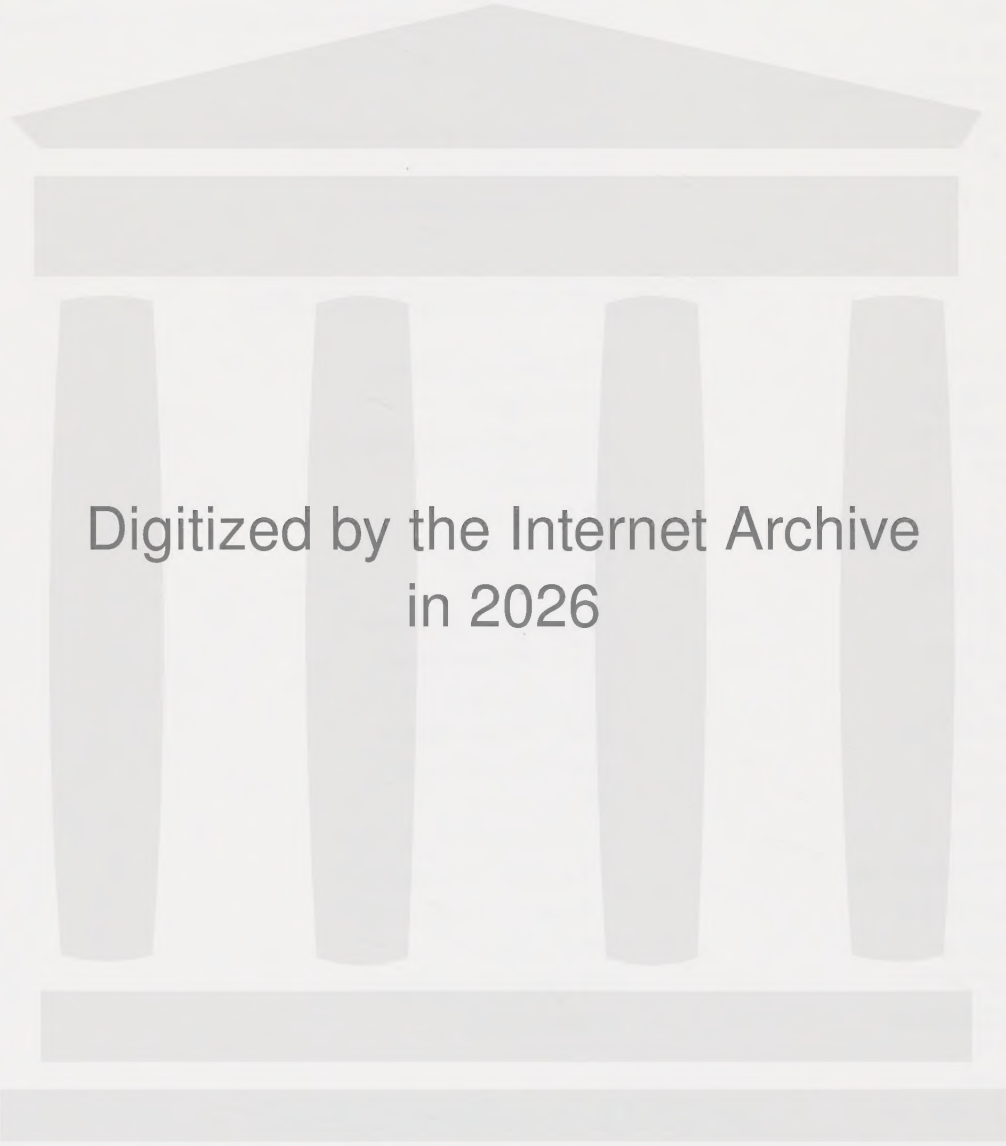
|                    |                                       |
|--------------------|---------------------------------------|
| TEICHNER           | Chimie industrielle                   |
| PAVANS DE CECCATTY | Zoologie                              |
| MERLIN             | Chimie analytique                     |
| DUFAY Maurice      | Physique de l'Atmosphère              |
| PHILBERT           | Physique nucléaire                    |
| COHEN-ADAD         | Chimie                                |
| DAVID Louis        | Géologie générale                     |
| CHANEL             | Psychophysiologie                     |
| MAURY              | Méthodes Mathématiques de la Physique |
| DEPRAZ             | Physique nucléaire                    |
| GAUTHIER Jean      | Chimie                                |
| GAUME              | Physique expérimentale                |
| UZAN               | Physique S. P. C. N.                  |
| LEGAY              | Biologie animale                      |

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

|               |                    |
|---------------|--------------------|
| MM. FERON     | Mathématiques      |
| LAFORGUE      | Physique           |
| CHENEVOY      | Géologie appliquée |
| GINET         | Zoologie           |
| ASCH          | Physique           |
| MICHEL Pierre | Minéralogie        |
| Mle MAITROT   | Physique           |
| GEVIN         | Géologie générale  |
| PONASSE       | Mathématiques      |
| d'INCAN       | Physique C. S. U.  |
| LEFEBVRE      | Mathématiques      |
| PERNET        | Mathématiques      |
| CHERY         | Physique           |
| BERGEON       | Physique C. S. U.  |
| Mle GAUTHERON | Chimie biologique  |
| DESCOTES      | Chimie organique   |
| ERBEIA        | Physique           |
| Mme ERICSON   | Physique générale  |
| LEMOIGNE      | Botanique          |

#### MAITRES DE CONFERENCES

|                 |                       |
|-----------------|-----------------------|
| MM MARTEL       | Mécanique             |
| MATHIEU         | Mécanique des Fluides |
| PICARD Philippe | Mathématiques         |
| DEMARCO         | Géologie générale     |
| MICHEL Georges  | Biochimie             |
| LEBRETON        | Biologie végétale     |
| DAVID Jean      | Biologie animale      |
| TOUSSET         | Chimie propédeutique  |
| FEUVRAIS        | Physique Electricité  |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553402\\_0002](https://archive.org/details/IA41553402_0002)

|     |            |                         |
|-----|------------|-------------------------|
| MM. | SCHMITT    | Physique C. P. E. M.    |
|     | LAURENT    | Chimie organique        |
|     | ROT        | Mathématiques           |
|     | BETHOUX    | Mathématiques T. M. P.  |
| Mle | CALAIS     | Mathématiques           |
|     | GUSAKOW    | Physique                |
| Mle | THOMAS     | Chimie minérale         |
|     | COLOBERT   | Physiologie             |
|     | AUBIN      | Analyse numérique       |
|     | BUCHWALTER | Mathématiques           |
|     | BOUZON     | Mathématiques C. S. U.  |
|     | COSNIER    | Psychophysiologie       |
| Mle | LAMOURE    | Biologie végétale       |
|     | PORTHAULT  | Chimie C. S. U.         |
|     | VALLET     | Chimie macromoléculaire |

MAITRE DE CONFERENCES ADJOINT

M. PIERRON Chimie

CONSEILLER ADMINISTRATIF

M. BURNET

SECRETAIRE PRINCIPAL HONORAIRE

M. ROUX



A MONSIEUR J. CHOPIN

PROFESSEUR A LA FACULTE DES SCIENCES DE LYON

Témoignage de profonde et respectueuse gratitude



A MES PARENTS

A MA FEMME



## AVANT - PROPOS

---

Ce travail a été effectué de 1963 à 1966 au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon.

Avant de l'exposer, nous exprimons notre sincère reconnaissance à notre Maître, Monsieur le Professeur J. CHOPIN pour l'attention bienveillante avec laquelle il a constamment guidé nos recherches, et les encouragements qu'il nous a prodigués.

Nous adressons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur J. COLONGE, Directeur de l'Ecole Supérieure de Chimie Industrielle de Lyon, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre Jury.

Monsieur E. BRICAS, Directeur du laboratoire de synthèse peptidique de l'Institut de Biochimie de la Faculté des Sciences de Paris, nous a accueilli avec bienveillance lors d'un stage effectué dans son laboratoire avec l'aimable autorisation du Professeur E. LEDERER. Il nous a donné ses conseils au cours de ce travail et de sa rédaction, et a accepté de faire partie de notre Jury, nous l'en remercions vivement.

Nous remercions Monsieur G. MICHEL, Maître de Conférences, qui a également accepté de faire partie de notre Jury.

Nous ne saurions oublier d'exprimer notre gratitude à la Société de Chimie Organique et Biologique, et en particulier à Monsieur A. WASMER, son Directeur Technique, pour l'aide matérielle qui a permis la réalisation de ce travail.

Nous remercions le personnel du Laboratoire de Microanalyse du C.N.R.S., et plus particulièrement Monsieur SEMET pour sa collaboration amicale et dévouée.

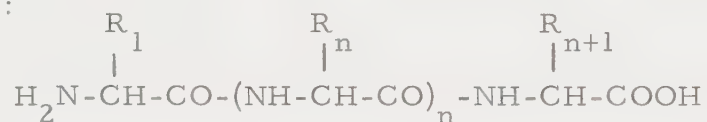
Nos remerciements vont aussi à Monsieur COMTE pour les analyses d'acides aminés effectuées dans son Laboratoire à l'Institut Technique du Cuir, ainsi qu'à Mademoiselle SENEJOUAND qui a bien voulu se charger des manipulations.

Enfin, que tous nos camarades de laboratoire trouvent ici l'expression de notre sincère amitié.



## INTRODUCTION

FISCHER (1) a donné en 1906 le nom de peptides ou polypeptides à une classe de composés formés d'enchaînements d'  $\alpha$  aminoacides liés par liaison amide :



Il est bien connu maintenant, que toutes les protéines sont essentiellement formées d'enchaînements de ce type. On a gardé le terme de peptides pour les composés de poids moléculaire inférieur à 10.000, dialysables sur cellophane (2).

Pour représenter commodément les chaînes peptidiques, les aminoacides sont symbolisés par leur abréviation, généralement les trois premières lettres de leur nom (3)(4).

### Aminoacides protéiques courants :

|                  |       |                |         |             |      |
|------------------|-------|----------------|---------|-------------|------|
| Alanine          | : Ala | Hydroxyproline | : Hypro | Proline     | :Pro |
| Arginine         | : Arg | Isoleucine     | : Ile   | Sérine      | :Ser |
| Acide aspartique | : Asp | Leucine        | : Leu   | Thréonine   | :Thr |
| Cystéine         | : Cys | Lysine         | : Lys   | Tryptophane | :Try |
| Glycocolle       | : Gly | Méthionine     | : Met   | Tyrosine    | :Tyr |
| Histidine        | : His | Phénylalanine  | : Phe   | Valine      | :Val |

Quelques aminoacides occasionnels :

|                                             |       |                                                     |        |
|---------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------|--------|
| Acide $\alpha, \epsilon$ -diamino butyrique | : Dab | Acide pipécolique (acide pipéridine-2-carboxylique) | : Pip  |
| Acide $\alpha$ -aminobutyrique              | : But | Citrulline                                          | : Cit  |
| Ornithine                                   | : Orn | Acide pyroglutamique                                | : Pyr. |

La lettre L ou D précédant ce symbole indique la configuration stéréochimique (la très grande majorité des aminoacides cités ayant la configuration L, nous omettrons d'indiquer la lettre L au cours de cet exposé).

Les résidus aminoacyles sont représentés par les mêmes symboles, un trait exprimant la perte de l'hydroxyle du groupement carboxylique (toujours à droite du symbole) ou de l'hydrogène d'une fonction amine, imine, guanidine, hydroxyle ou thiol (la fonction  $\alpha$  aminée étant à gauche du symbole, les fonctions des chaînes latérales au-dessus ou au-dessous).

Les aminoacides substitués sont donc représentés logiquement par le symbole précédent complété du groupement de substitution, et l'acide libre peut l'être également par le symbole de son résidu, complété par H ou OH :



La chaîne peptidique est représentée par les symboles des résidus d'aminoacides reliés par un trait suivant leur mode de liaison, et numérotés à partir de l'extrémité N. terminale de la chaîne, toujours à gauche dans les peptides linéaires. Pour les peptides cycliques, la liaison peut être plus clairement représentée par une flèche indiquant la direction  $\text{CO} \rightarrow \text{NH}$ .

Les premières synthèses d'enchaînements peptidiques ont été effectuées dès le début de ce siècle, mais c'est depuis la découverte, il y a moins de 15 ans, de peptides simples, possédant une activité physiologique,

que cette branche bien spécialisée de la chimie organique a pris l'ampleur que nous lui connaissons maintenant. Les synthèses portent sur les produits naturels eux mêmes ainsi que sur leurs analogues structuraux, c'est-à-dire des peptides obtenus par modification de leurs aminoacides constitutifs ou de certains de leurs groupements fonctionnels.

Nous avons entrepris la synthèse de plusieurs analogues de la bradykinine, nonapeptide naturel ayant une structure relativement simple et des propriétés hypotensives et ocytociques intéressantes.

Notre travail, portant sur la synthèse de la 1-9-lysine-bradykinine et trois de ses analogues glyciniques est exposé en quatre parties :

- Dans un premier chapitre, nous étudions succinctement les modifications effectuées sur les principaux peptides actifs actuellement connus (en particulier sur la bradykinine) et les conclusions que l'on peut en tirer.
- Le second chapitre est consacré aux méthodes générales de synthèse peptidique.
- Le troisième chapitre à la description des schémas de synthèse que nous avons utilisés.
- Le quatrième et dernier chapitre à la partie expérimentale de notre travail.



## CHAPITRE I

### ANALOGUES STRUCTURAUX DES PEPTIDES NATURELS ACTIFS RAPPORTS STRUCTURE-ACTIVITE

Avant 1940, il n'existait aucun intermédiaire naturel connu entre les peptides très simples isolés depuis longtemps (carnosine, ansérine, glutathion), et les protéines. Les progrès réalisés depuis dans les techniques de séparation: chromatographie sur papier, sur échangeurs d'ions, électrophorèse, distribution à contre-courant, ont fait croître de plus en plus rapidement le nombre des peptides naturels. Leur origine et leurs propriétés sont extrêmement diverses (phalloïdine de l'Amanite phalloïde, alcaloïdes de l'ergot de seigle, peptides bactériens parmi lesquels la famille des peptides antibiotiques, hormones peptidiques des animaux supérieurs). En même temps le progrès réalisé dans le domaine de l'analyse physique, chimique et enzymatique des enchaînements peptidiques permettait une détermination de plus en plus rapide de leur structure.

L'intérêt présenté par l'activité physiologique de certains de ces peptides (antibiotiques, hormones, kinines) a immédiatement suscité un développement des recherches sur la synthèse de ces peptides et sur les rapports qui peuvent exister entre la structure et l'activité de ces enchaînements relativement simples.

Avant même que la structure de tels composés ne soit totalement établie par synthèse, cette étude peut être entreprise par introduction de groupements variés sur les fonctions chimiques des produits naturels ou par scission de certaines liaisons de leur molécule, entraînant ou non la disparition de leur activité.

Les modifications que l'on peut ainsi effectuer sont cependant limitées: seules, les synthèses d'analogues permettent une étude systématique de l'influence des divers éléments de la molécule sur l'activité.

Nous examinerons donc tout d'abord les procédés utilisés, puis les résultats obtenus dans le cas des peptides hormonaux d'une part, des peptides vaso-actifs d'autre part.

## I - REALISATION D'ANALOGUES STRUCTURAUX DES PEPTIDES NATURELS

Dans les analogues synthétiques des peptides actifs, les modifications peuvent porter, soit sur le squelette même de la chaîne (suppression ou addition d'acides aminés), soit sur les chaînes latérales (modification d'un résidu aminoacyle ou remplacement de celui-ci par un autre).

Surtout lorsqu'il s'agit d'une chaîne peptidique importante, la première détermination effectuée est celle des segments, quelquefois réduits, retenant la totalité ou une fraction de l'activité du produit naturel; c'est sur ces portions de chaîne que portent ensuite les études plus détaillées. Certains analogues ont été réalisés par suppression d'un ou plusieurs résidus à l'intérieur de la chaîne.

Les fonctions chimiques (amine, acide, alcool, thiol), ainsi que les groupements phényle ou imidazole portés par les chaînes latérales des résidus aminoacyles ou par les extrémités de la chaîne principale, peu-

vent être modifiés :

- soit par substitution par des groupements annexes,
- soit au contraire par libération, si elles sont masquées dans les peptides naturels,
- soit enfin par élimination totale.

Les analogues synthétiques des peptides actifs formés par remplacement d'un aminoacide par un autre, sont de loin les plus nombreux.

Le choix de ces analogues est basé sur des considérations d'encombrement stérique, d'isologie, de polarité ou de réactivité des chaînes latérales, ou simplement inspiré par les modifications que l'on trouve dans les analogues naturels.

Ils sont représentés habituellement par le nom du peptide naturel dont ils dérivent, précédé du ou des aminoacides de remplacement, avec la place qu'ils occupent dans la chaîne.

1) Suppression de la fonction réactive. Seul le groupement fonctionnel du résidu est éliminé, la chaîne hydrocarbonée restant identique. C'est ainsi que la sérine et la tyrosine sont respectivement remplacées par l'alanine et la phénylalanine.

2) Remplacement du groupement réactif par un autre.

Ces modifications sont en général réalisées pour étudier l'influence de la polarité du résidu aminoacyle; les charges positives de la lysine ou de l'arginine peuvent être remplacées l'une par l'autre, ou toutes deux par la charge opposée de l'acide glutamique.

Toute une série d'analogues de peptides contenant de l'arginine a été synthétisée en remplaçant cet aminoacide par la citrulline: la géométrie de la chaîne, ainsi que les possibilités de liaisons hydrogène sont ainsi conser-

vées et son caractère fortement basique supprimé. Par contre, lorsqu'on remplace l'arginine par l'homolysine, la charge est conservée, mais elle est localisée sur un seul atome au lieu de trois.

### 3) Remplacement de la chaîne latérale par son homologue.

La seule modification apportée est alors l'addition ou la suppression d'atomes de la chaîne hydrocarbonée du résidu, ce qui influe sur sa longueur, sa flexibilité et son encombrement et par suite sur la position du groupement fonctionnel lorsqu'il existe.

Par exemple :

- remplacement de la lysine,  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{NH}_2}{\underset{|}{\text{CH}}}-\text{COOH}$  où  $n = 4$  par l'ornithine ( $n = 3$ ), l'homolysine ( $n = 5$ ), l'acide  $\alpha,\omega$ -diaminobutyrique ( $n = 2$ ) :

- remplacement de l'acide aspartique et de l'acide glutamique l'un par l'autre.

- remplacement de la proline  $(\text{CH}_2)_n-\begin{matrix} \diagup & \text{CH}-\text{COOH} \\ & | \\ & \text{NH} \end{matrix}$  où  $n = 3$  par l'acide pipécolique ( $n = 4$ ).

### 4) Suppression de la chaîne latérale :

Le remplacement d'un aminoacide quelconque par le glycolle ou l'alanine (le plus simple de ceux comportant encore un carbone asymétrique) a souvent été effectué, supprimant ainsi à la fois tout groupement réactif et l'influence stérique du résidu, sans modifier pour autant le squelette de la chaîne peptidique.

### 5) Remplacement d'un aminoacide par son isomère optique.

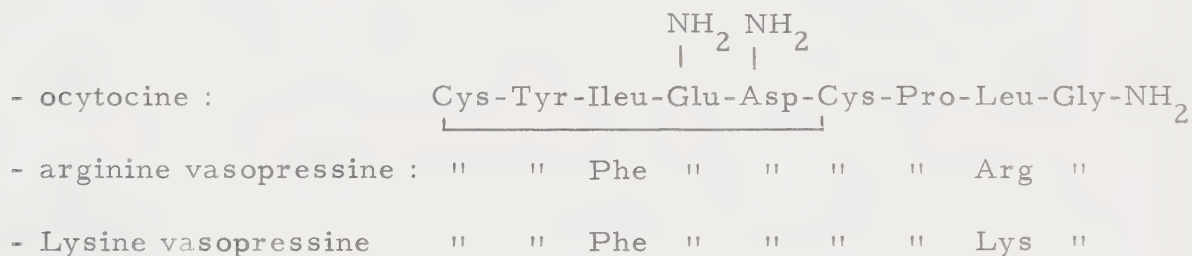
La découverte de D-aminoacides dans les peptides synthétisés par les organismes inférieurs, a donné l'idée depuis longtemps de remplacer certains L-aminoacides des peptides hormonaux par leur isomère optique. Dans ce cas, seules les positions relatives des groupements de la chaîne sont modifiées.

## II - PEPTIDES HORMONAUX

Nous verrons rapidement les résultats obtenus dans l'étude des relations structure-activité pour trois groupes d'hormones peptidiques : les hormones post-hypophysaires, antéhypophysaires et les gastrines.

### A - HORMONES POST-HYPOPHYSAIRES

Depuis 1949, trois hormones ont été isolées à partir de la post-hypophyse des mammifères: l'ocytocine (5), première hormone peptidique dont la synthèse ait été réalisée (Du Vigneaud (6) ) et deux vasopressines (7) (8), dont les enchaînements présentent de nombreuses analogies :



Ces trois peptides présentent des activités hormonales communes (9), mais avec des différences quantitatives importantes: (contraction des muscles utérins et mammaires, hypertension chez les mammifères , hypotension chez les oiseaux, action antidiurétique).

Les études phylogéniques menées par Acher et coll. ont conduit à la découverte d'autres peptides apparentés à l'ocytocine : la vasotocine (10) chez le poulet et la grenouille (8. arginine-ocytocine), la mésotocine (8. isoleucine-ocytocine) chez les batraciens, l'isotocine (4. Sérine\_8. isoleucine\_ocytocine) et la glumitocine (4. Sérine\_8. glutamine-ocytocine) chez les poissons osseux.(11)

Plus d'une centaine d'analogues synthétiques de ces peptides a. maintenant été préparée, montrant tout d'abord que l'ensemble de

9 amino acides est indispensable à l'activité de ces peptides; la suppression de l'un d'entre eux donne toujours des produits très peu actifs; seules des modifications de détails peuvent être effectuées, affectant plus ou moins profondément l'un ou l'autre type d'activité (12-13); par exemple :

- la suppression de la fonction amine N.terminale de l'ocytocine et des vasopressines conserve leur activité.
- l'hydroxyle de la tyrosine en 2 n'est aucunement indispensable: sa suppression cause peu de modification d'activité (par contre, l'éthérisation donne un produit inactif ou même inhibiteur de l'ocytocine).
- le groupement basique en 8 est nécessaire à l'activité vasopressique.
- dans les vasotocines, ou 3-Ile-vasopressines, l'activité, comme la structure, est intermédiaire entre celle de l'ocytocine et des vasopressines.

Dans toute cette famille de peptides, on remarque l'importance particulière du cycle de 20 atomes formé par le pont disulfure entre les cystéines 1 et 6; il ne peut être ouvert, ni sa taille modifiée. Cependant les atomes de soufre eux-mêmes peuvent être remplacés soit par des groupements  $\text{CH}_2$ , soit par des atomes de sélénium, sans que soit affectée profondément l'activité de ces peptides (14).

## B - CORTICOTROPINE ET MELANOTROPINE.

Parmi les autres hormones hypophysaires également étudiées, l'ACTH ou corticotropine et les MSH (mélanotropines) occupent une place importante.

L'ACTH se présente comme une chaîne de 39 aminoacides(15), la séquence 25-33 variant suivant les espèces animales. L' $\alpha$ -MSH (16) est formée des 13 premiers aminoacides de l'ACTH, la sérine N-terminale étant acétylée et la fonction carboxylique terminale amidifiée. L'enchaînement



de la  $\beta$ -MSH (17) comportant 18 résidus, possède la séquence 4-10 de l'ACTH en position 7-13; dans les différentes espèces étudiées, certains aminoacides diffèrent, mais jamais à l'intérieur de cette séquence 7-13.

Il s'est avéré, et les variations trouvées dans les différentes espèces animales le laissaient prévoir, que certains segments seulement de ces longues chaînes possédaient la quasi totalité de l'activité des peptides.

Alors que l'altération du segment N-terminal de l'ACTH est cause d'une perte totale d'activité (18), une chaîne importante peut être supprimée, au contraire, sur l'extrémité C-terminale. La partie commune aux A.C.T.H. des différentes espèces animales (segment 1-24), ainsi que le segment 1-20, gardent l'activité du peptide complet. (19)

Pour les peptides à activité mélanotropique, les résultats sont encore plus nets, puisque le simple pentapeptide H. His. Phe. Arg. Try. Gly. OH faisant partie du segment commun à l'A.C.T.H. et aux M.S.H. conserve une activité importante.

Un autre résultat intéressant fut la découverte de l'inhibition de l'activité M.S.H. par le pentapeptide symétrique, entièrement formé de résidus D.aminoacyles(20), propriété qui ne s'est retrouvée dans aucun des autres D-peptides synthétisés depuis.

### C- GASTRINES.

Plus récemment, deux peptides furent isolés de la muqueuse stomacale de porc: les gastrines I et II qui sont en rapport avec la sécrétion gastrique chez les mammifères. Elles sont formées toutes deux du même enchaînement de 17 aminoacides (21); la tyrosine 12 de la gastrine II étant de plus estérifiée par un groupement sulfate.

#### Gastrine I .

H. Pyr. Gly. Pro. Tyr. Met. Glu. Glu. Glu. Glu. Glu. Ala. Tyr. Gly. Try. Met. Asp.  
Phe. NH<sub>2</sub>

On a montré que l'activité totale de ces peptides était conservée dans le tétrapeptide C-terminal (21) dont la modification ne peut être effectuée sans perte d'activité importante.

### III - BRADYKININE ET AUTRES PEPTIDES VASOACTIFS.

Deux groupes de produits peptidiques ont été isolés jusqu'à ce jour par action d'enzymes protéolytiques sur les globulines plasmatiques : les angiotensines aux propriétés hypertensives et les kinines (dont la bradykinine) dont l'action est inverse.

L'angiotensine II (ou hypertensine II) est la forme active de l'angiotensine I dont elle dérive par scission enzymatique des deux aminoacides C-terminaux.

angiotensine I : H. Asp. Arg. Val. Tyr. Ile. His. Pro. Phe. His. Leu. OH

angiotensine II : H. Asp. Arg. Val. Tyr. Ile. His. Pro. Phe. OH

La suppression de la fonction amine terminale, ou de l'asparagine en 1 ne modifie pas considérablement l'activité de ces peptides; par contre, l'hexapeptide C-terminal de II ne peut subir que de faibles modifications. Il est à noter que l'activité hypertensive de la 1-D-Asp.angiotensine est plus durable que celle du produit naturel (22).

#### A)- ISOLEMENT ET STRUCTURE DE LA BRADYKININE

On a donné le nom général de kinines du plasma aux produits peptidiques libérés par action d'enzymes, dits kininogènes, sur les protéines du plasma sanguin (plus précisément les  $\alpha_2$  - globulines). Ces peptides ont des propriétés pharmacologiques communes, ne permettant pas de les différencier.

La bradykinine, premier de ces peptides isolé à l'état pur, fut décrite en 1949 par Rocha e Silva (23). Par la suite, Elliott et coll. (24) l'obtiennent par action de HCl, puis de la trypsine sur la fraction de sérum de bovin précipitée entre 33 % et 43 % de saturation en sulfate d'ammonium, et l'isolent par chromatographie et électrophorèse (24, 25). Ces mêmes auteurs lui attribuent alors la structure d'un octapeptide : H. Arg. Pro. Pro. Gly. Phe. Ser. Phe. Arg. OH, hypothèse démentie par Boissonnas et ses coll., qui synthétisent ce composé et le trouvent inactif. C'est la synthèse d'une série d'octapeptides et de nonapeptides analogues qui leur permet de déterminer la structure exacte de la bradykinine (26), confirmée par de nouveaux travaux d'Elliott sur le produit naturel (27).

L'enchaînement exact est celui d'un nonapeptide possédant bien l'arginine à chaque extrémité, mais 3 résidus prolyl et non 2 :



Par ailleurs, Jacques et Meier obtiennent également la bradykinine à partir du plasma de boeuf, par action du venin de Bothrops jararaca. Les propriétés physiologiques du produit ainsi obtenu sont identiques à celles de la bradykinine précédemment isolée et synthétique (28).

## B - ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE

La dose létale de ce peptide est de 16-20 mg/kg pour la souris blanche, certains auteurs donnent 70 mg/kg (29).

L'activité essentielle est la contraction des muscles lisses in vitro, elle est exclusivement myotropique, n'affectant que les muscles longitudinaux. L'organe le plus sensible à ce test est l'utérus de rat : 0,03 à 0,1 mg/cm<sup>3</sup>, alors que le myomètre humain n'est influencé qu'à fortes doses. L'iléon de cobaye, rat, lapin, chat ou chien réagit également à fai-

ble dose:  $\text{ng}/\text{cm}^3$  (30); certains organes comme le duodénum de rat répondent à l'action de la bradykinine, non par contraction, mais par relaxation, alors que le colon de rat et le duodénum de lapin réagissent d'abord par relaxation, puis par contraction (31).

Par injection chez le cobaye anesthésié à l'uréthane, la bradykinine cause la bronchoconstriction (31), elle a le même effet en aérosols chez les asthmatiques, mais par contre n'a pas d'action sur les muscles bronchiaux in vitro (32).

Chez tous les mammifères une chute brève de tension artérielle suit l'administration de bradykinine (33):  $0,05 \mu\text{g}/\text{kg}$  pour le lapin ou le chien,  $40$  à  $80 \mu\text{g}/\text{kg}$  pour la poule. On a pu observer divers autres effets sur la circulation sanguine chez le chien: augmentation de pression artérielle dans la carotide, dilatation des vaisseaux sanguins cérébraux, ainsi que de l'artère pulmonaire, augmentation de la fréquence cardiaque et du flux sanguin.

On a également observé, chez le cobaye ou le lapin anesthésiés, une augmentation brève du rythme respiratoire.

Chez l'homme, l'injection de bradykinine provoque la dilatation des artères périphériques, la diminution de pression diastolique et systolique et l'augmentation des pulsations; l'injection sous-cutanée augmente la perméabilité capillaire (27), une dose supérieure à  $0,01 \mu\text{g}$  provoque un oedème.

D'une manière générale, la bradykinine cause la contraction des muscles lisses in vitro, une contraction des muscles bronchiaux in vivo, ainsi qu'un abaissement de tension artérielle dû à une augmentation de perméabilité et à un relâchement des vaisseaux sanguins, ce qui entraîne par ailleurs une augmentation du flux sanguin.

## C - ANALOGUES NATURELS DE LA BRADYKININE

Dès 1961, WERLE (34a) isole la kallidine par incubation du sérum de bovin par la kallikréine submaxillaire; les propriétés de cette nouvelle kinine ne diffèrent que de manière quantitative de celles de la bradykinine. L'auteur montre ainsi qu'il existe plusieurs peptides actifs parmi les kinines du plasma.

La structure de ce nouveau peptide est celle de la lysyl-bradykinine (34a).

PIERCE et WEBSTER (34b) obtiennent le même produit à partir du plasma humain.

En 1963, ELLIOTT et coll. (35) isolent d'une fraction de plasma de bovin, incubée à pH 7,5 après traitement acide, un nouveau peptide actif dont la structure est celle de la méthionyl-lysyl-bradykinine.

L'une et l'autre de ces substances, traitées par l'aminopeptidase ou par la trypsine donnent la bradykinine.

La kallidine et la méthionyl-lysyl-bradykinine sont moins actives ( $2/3$  à  $1/4$ ) que la bradykinine en ce qui concerne la contraction des muscles, mais par contre, elles agissent 2 à 3 fois plus sur la tension artérielle (35).

## D - ANALOGUES SYNTHETIQUES DE LA BRADYKININE

Lorsque nous avons commencé ce travail peu de choses nous étaient connues sur les rapports entre la structure de la bradykinine et son activité.

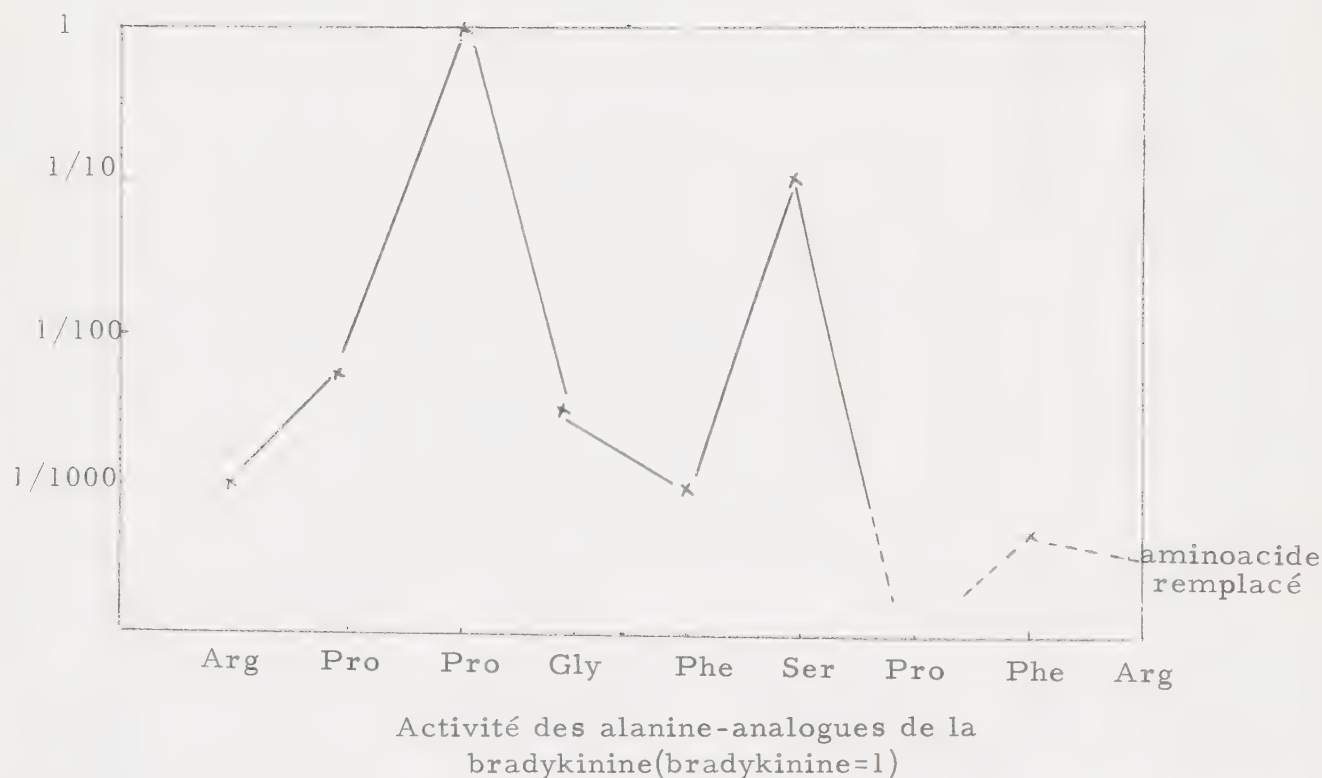
Les premiers analogues synthétisés par BOISSONNAS (36), au cours de la détermination de la structure, avaient mis en évidence l'importance des résidus prolyl: la bradykinine où manque la proline en 7 est

totaleme nt inactive et celle où manque la proline en 2 ne possède qu'une faible activité. BODANSZKY(37) avait constaté que la 1,9-nitro arginine-bradykinine n'était pas active, et VOGLER (38) que la 1.9.acide diaminobutyrique-bradykinine ne l'était que très faiblement.

Mais depuis trois ans, l'intérêt suscité par les propriétés de la bradykinine ont fait se multiplier les analogues synthétiques de ce peptide d'une structure relativement simple (29); jusqu'à ce jour, environ 80 analogues des kinines ont été décrits, montrant que tous les aminoacides de la chaîne sont nécessaires et que, seules quelques modifications de détail peuvent être effectuées; tous les analogues synthétisés possèdent des activités nettement inférieures à celle du produit naturel; trois exceptions importantes cependant : la 6-glycine-bradykinine (39), la 3-Alanine-bradykinine (40), les 8-para fluoro. L.phénylalanine et 8-parafluoro. D.phénylalanine-bradykinine (41); les deux premiers ont même activité que la bradykinine, les derniers ont des propriétés hypotensives plus importantes que celles du produit naturel.

Il a été prouvé que la symétrie de la molécule n'était qu'apparente: la 2-phénylalanine-4-sérine-6-glycine-8-proline-bradykinine ( rétro-bradykinine) étant totalement inactive. Les remplacements de l'arginine N-terminale suppriment sensiblement plus l'activité que ceux de l'arginine C-terminale. Ces résultats sont inversés par suppression de l'un ou l'autre de ces résidus (29). Les remplacements des arginines par le glycocolle , l'alanine, la citrulline, l'ornithine montrent que ces aminoacides terminaux interviennent à la fois par leur basicité et leur géométrie.

SCHRÖDER a choisi la bradykinine pour effectuer le remplacement successif de chaque résidu par un seul: l'alanyl ; l'activité par rapport à la bradykinine, de chacun des analogues ainsi obtenus, donne " une courbe d'importance" de chaque amino acide de la chaîne (29).



L'activité de la kallidine laissait prévoir que certaines additions pouvaient être effectuées sur l'extrémité N-terminale de la bradykinine; mais les additions sur l'extrémité C-terminale, par contre, donnent des produits inactifs (42).

Enfin, les quelques analogues de la kallidine semblent montrer que l'action hypotensive est moins affectée pour des remplacements identiques que dans la bradykinine.

Récemment, deux autres peptides, d'une toute autre origine que les précédents, ont été isolés; leur activité, de même type que celle de la bradykinine est beaucoup plus importante, mais leur structure primaire ne présente aucun rapport, ce sont :

- l'élédoisine (43) isolée des glandes salivaires d'une pieuvre de la Méditerranée:



-la physalaemine (44), isolée de la peau d'un animal amphibien d'Amérique du Sud):



La séquence 5-11 a été reconnue pour être la partie essentiellement active de ces peptides (45); et le peptide correspondant à la séquence 3-11 possède une activité environ double de celle du peptide naturel.

### CONCLUSION -

Les études intensives, menées actuellement sur les rapports entre structure et activité des peptides, ont permis de simplifier considérablement le problème dans le cas de peptides à longues chaînes, en déterminant les segments qui sont de véritables centres actifs ; d'autre part, elles ont mis en évidence (sauf dans le cas de l'ACTH et des MSH), l'importance particulière de la fonction acide terminale (libre ou amidifiée), et du segment voisin.

La synthèse d'analogues est la méthode d'étude la plus générale des rapports structure-activité, dans les peptides; elle seule permet une étude détaillée de l'influence de chacun des aminoacides constitutifs, en les supprimant ou surtout en les remplaçant par d'autres.

L'importance relative de chaque aminoacide, par exemple, peut être déterminée, en les remplaçant successivement par un aminoacide unique, comme l'a fait SCHRÖDER pour la bradykinine.

Le remplacement d'un aminoacide d'une chaîne par divers autres judicieusement choisis, permet de déterminer l'influence de chacune de ses caractéristiques (basicité, acidité, géométrie de la chaîne latérale). Ainsi, la basicité et la géométrie des arginines interviennent également dans

l'activité de la bradykinine ou de l'angiotensine, au contraire, la basicité seule de cet aminoacide en 8 dans la vasopressine est prépondérante pour son activité.

L'intégration, à une position déterminée, d'acides aminés non protéiques, comme les D-aminoacides, la parafluorophénylalanine L ou D en position 8 de la bradykinine, la sélénocystéine en 1 et 6 de l'ocytocine, a prouvé que les analogues ainsi obtenus pouvaient posséder des propriétés physiologiques intéressantes.

Dans une famille de peptides comme celle de l'ocytocine et des vasopressines, il a été possible de montrer l'influence de chacun des deux aminoacides qui les différencient, sur leurs deux types d'activité, en synthétisant les peptides intermédiaires.

Tous les résultats prouvent que dans les peptides, activité et structure sont très intimement liés et que les modifications que l'on peut effectuer sur celle-ci, entraînent le plus souvent une baisse d'activité considérable ; les conclusions que l'on peut en tirer ne sont valables que pour un peptide donné, et même, pour un type d'activité seulement.

On peut cependant espérer obtenir des analogues synthétiques possédant une sélectivité d'action physiologique plus importante que celle du produit naturel, ce qui n'est pas sans intérêt sur le plan thérapeutique.

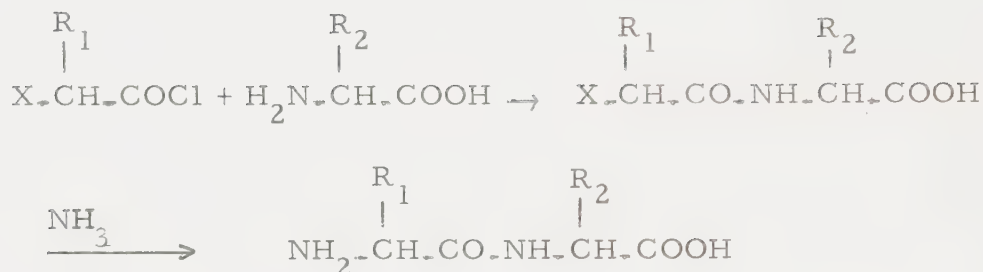
## CHAPITRE II

### METHODES DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

#### I - HISTORIQUE

Les premiers travaux de synthèse peptidique au début de ce siècle ont été réalisés alors que la structure des protéines n'était encore qu'une hypothèse; ils ont dès le départ suivi deux voies parallèles: la synthèse de chaînes macromoléculaires, polymères de quelques aminoacides, et celle de chaînes courtes à enchaînements définis; ce sont ces derniers travaux qui ont pris le nom de synthèse peptidique.

Le premier dérivé peptidique: le N.benzoyl-Gly-Gly-OH est préparé par CURTIUS en 1882 (46), alors que FISCHER obtient le premier dipeptide libre (47). Ces deux auteurs font des tentatives pour mettre au point des méthodes de protection temporaire mais sans y parvenir. C'est alors que FISCHER développe la méthode des  $\alpha$ -halogénoacides: la synthèse est effectuée par action du chlorure d' $\alpha$ -halogénoacide sur l'aminoacide voisin,  $\text{NH}_2$  étant ensuite substitué à Cl ou Br par action de l'ammoniac.



L'emploi de cette méthode posait de très gros problèmes, en particulier pour la synthèse des chlorures d'acides  $\alpha$ -halogénés optiquement actifs, et ne pouvait permettre l'intégration d'acides aminés basiques.

En 1932 seulement, BERGMANN et ZERVAS introduisent le premier groupement protecteur d'un emploi général: le benzyloxycarbonyle (48), qui leur permet de préparer les peptides simples servant de substrat dans leurs travaux sur la spécificité des enzymes protéolytiques; les peptides naturels simples, connus alors, sont également préparés à cette époque : carnosine, glutathion.

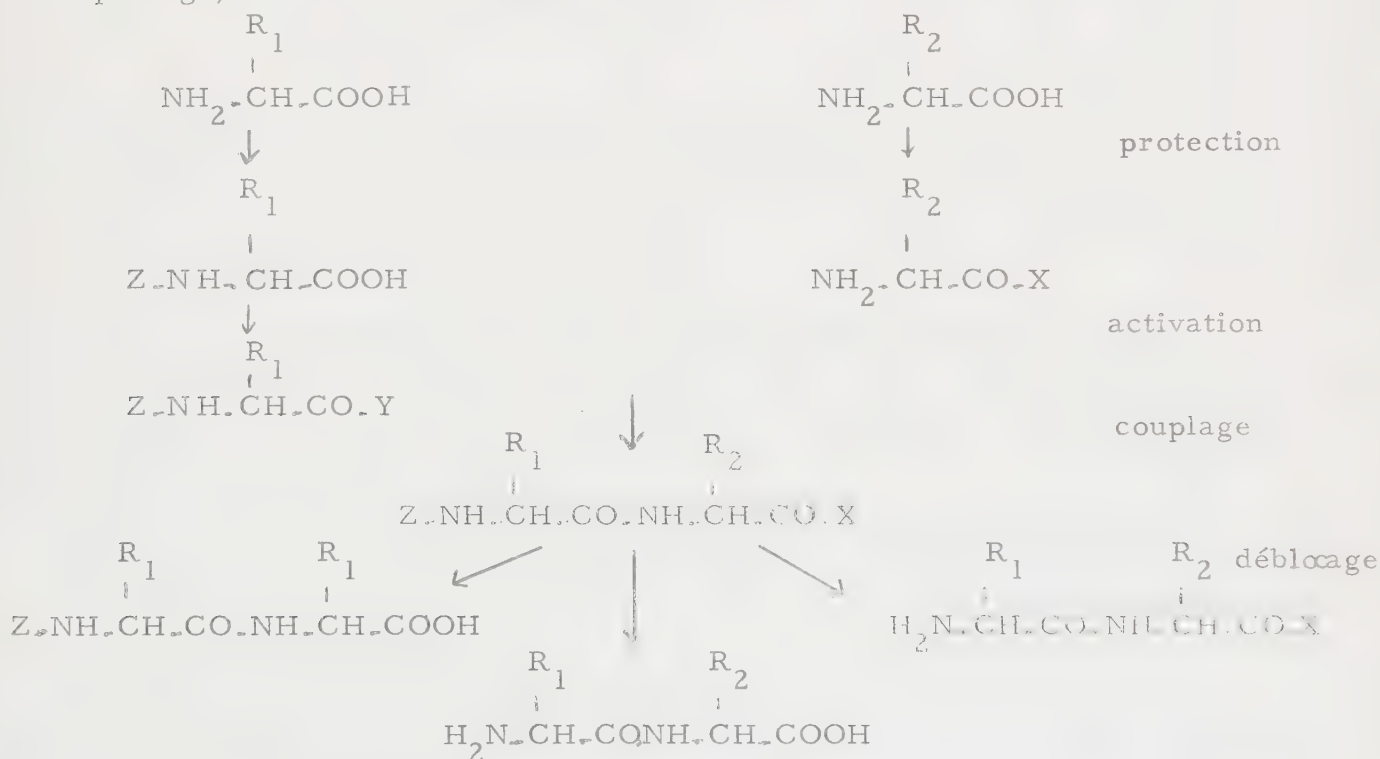
La connaissance des structures des peptides bactériens, pendant les années 40, a ensuite encouragé les recherches pour trouver d'autres techniques de synthèse. En 1953, la synthèse de l'ocytocine (6) est suivie par celle des autres hormones peptidiques, la dernière en date étant celle de l'insuline (49).

Depuis la parution en 1961 de l'ouvrage détaillé de GREENSTEIN (50), les revues écrites par BRICAS en 1961 (51), WIELAND en 1963 (52) et enfin SCHRÖDER en 1965 (53) montrent les progrès récents réalisés dans les méthodes de synthèse peptidique.

## II - SCHEMA DE LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE -

Le problème de la synthèse peptidique est résolu, en principe, lors de la préparation d'un dipeptide déterminé, à partir de deux aminoacides donnés: la fonction acide de l'un doit former avec la fonction amine de l'autre une liaison amide ou liaison peptidique.

Ceci est obtenu en quatre étapes: la protection, par des radicaux appropriés, des groupements chimiques qui ne doivent pas entrer en réaction; l'activation de l'une des fonctions devant former la liaison, sous forme d'un composé riche en énergie; le couplage proprement dit, et enfin, l'élimination des groupements protecteurs introduits dans la première étape (ou de l'un d'entre eux seulement pour continuer la synthèse avec ce nouveau dérivé protégé).



Ce schéma se retrouve pour la préparation de chaînes plus importantes, l'un ou l'autre des aminoacides étant alors remplacé par un segment peptidique.

Nous avons représenté ici le cas le plus courant, l'activation a lieu sur le carboxyle; certaines méthodes utilisent également l'activation de la fonction amine; enfin l'emploi des réactifs dits "activants" permet la formation de la liaison amide sans passer par l'intermédiaire d'un composé actif isolé.

Il est à noter qu'au cours d'un couplage par composé actif du carboxyle, seul le groupement protecteur (Z) de l'amine mérite ce nom, celui de l'acide (X) ne sert en fait qu'à transformer la fonction  $\text{-NH}_3^+$  de l'ion dipolaire en fonction basique réactive; le contraire est exact dans le cas du couplage par activation de la fonction amine.

Nous verrons successivement les conditions générales imposées à ces diverses opérations, les principaux groupements protecteurs de l'amine, ceux du carboxyle et enfin les méthodes d'activation.

### III - CONDITIONS GENERALES RELATIVES AUX OPERATIONS DE SYNTHESE

#### A) SELECTIVITE DES GROUPEMENTS PROTECTEURS

En cours de synthèse, on doit pouvoir enlever séparément les groupements protecteurs de l'amine et du carboxyle pour continuer les couplages sur la fonction unique ainsi libérée. Dans certains cas, en fin de synthèse en particulier, il peut être utile au contraire, de supprimer tous les groupements protecteurs en même temps, pour obtenir le peptide libre en une seule opération.

Il est souvent obligatoire de protéger également les groupements chimiques portés par les chaînes latérales des aminoacides: fonction amine, imidazole, carboxylique, alcool, thiol ou phénol (les méthodes de couplage peuvent cependant être suffisamment douces pour ne pas rendre néces-

saire la protection des fonctions autres que les fonctions acides ou basiques). Les groupements protecteurs, de même type que ceux utilisés pour la chaîne principale, doivent répondre aux mêmes conditions de sélectivité et ne s'éliminent généralement qu'en fin de synthèse.

#### B) ELIMINATION DES GROUPEMENTS PROTECTEURS

La liaison peptidique ne résistant pas aux réactifs énergiques, les opérations de déblocage doivent être réalisées dans des conditions suffisamment douces pour ne pas détruire la chaîne peptidique formée.

Historiquement, cette condition n'a été remplie qu'en 1932 avec l'introduction des dérivés benzyloxycarboxylés.

#### C) RENDEMENTS

Le nombre des opérations nécessaires pour réaliser une chaîne peptidique impose d'avoir des rendements satisfaisants pour chacune des étapes. Ceci est valable non seulement sur le plan industriel, mais également sur le plan du laboratoire, lorsque les chaînes préparées sont importantes.

#### D) PURIFICATION DES PRODUITS INTERMEDIAIRES

L'une des difficultés de la synthèse peptidique réside en la purification des produits obtenus.

Les réactions secondaires en cours de couplage donnent souvent des produits comportant eux-mêmes des chaînes peptidiques, extrêmement difficiles à éliminer.

On essaie donc d'utiliser des méthodes ne donnant que le minimum de produits parasites d'une part, et d'autre part il est fort utile, mais pas toujours possible, que les intermédiaires de la synthèse soient facilement

cristallisables, ce qui permet d'éviter des purifications longues par chromatographie, électrophorèse ou distribution à contre-courant. La facilité de cristallisation des dérivés peptidiques dépend en grande partie des groupements protecteurs utilisés.

## E) RACEMISATION

### 1) Introduction :

Une condition plus spécifique des différentes opérations de synthèse peptidique est la non racémisation des résidus d'acides aminés introduits dans la chaîne.

L'obtention de stéréoisomères purs est une nécessité absolue lorsqu'on prépare des peptides physiologiquement actifs.

D'autre part, même si la racémisation de chaque résidu est faible, on arrive très vite, avec les peptides importants, à avoir un rendement médiocre en peptide optiquement pur. C'est ainsi que dans une chaîne de 100 L-acides aminés, chacun étant racémisé à 1 % seulement, le rendement terminal en peptide entièrement L n'est que de 37 %.

Il est enfin très difficile d'avoir des renseignements sur l'homogénéité stéréochimique d'une chaîne peptidique: le pouvoir rotatoire total peut ne varier que très peu lorsque la chaîne est importante; les isomères optiques, lorsqu'il y a plus de 2 ou 3 centres d'asymétrie, sont impossibles à séparer par chromatographie; l'hydrolyse totale cause toujours une racémisation plus ou moins importante des résidus, seules les méthodes enzymatiques de dégradation, longues à mettre en oeuvre, donnent des renseignements valables.

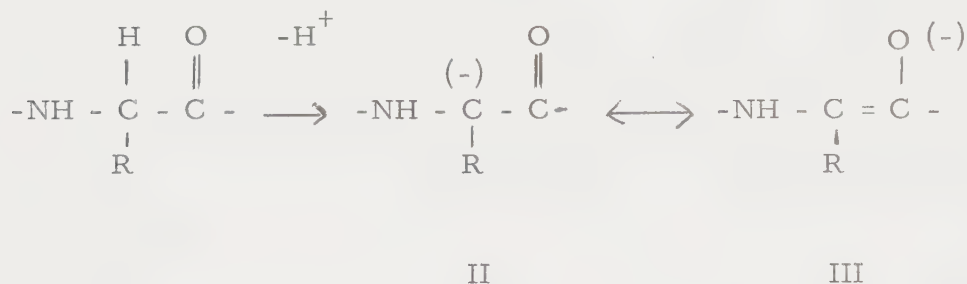
Pour toutes ces raisons, il a été nécessaire de faire des études systématiques sur les méthodes de protection et de couplage, afin de déterminer celles qui ne causent pas de racémisation ou, du moins, dans

quelles conditions les dangers de racémisation étaient limités. C'est ainsi que bon nombre de méthodes chimiquement valables ont dû être écartées, car elles conduisaient à des peptides dont l'homogénéité n'était pas certaine.

## 2) Mécanisme de racémisation :

Dans le cas des résidus d'acides aminés, la racémisation est catalysée en milieu acide ou basique, le mécanisme doit commencer par l'ionisation du carbone asymétrique, une migration électronique conduisant ensuite à une molécule ou à un ion symétrique (54); deux mécanismes sont à envisager :

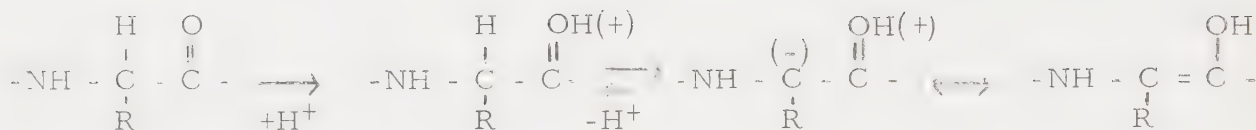
- En milieu basique, on aurait d'abord l'élimination d'un proton:



L'énergie de résonance  $\text{II} \longleftrightarrow \text{III}$  permettant l'ionisation initiale.

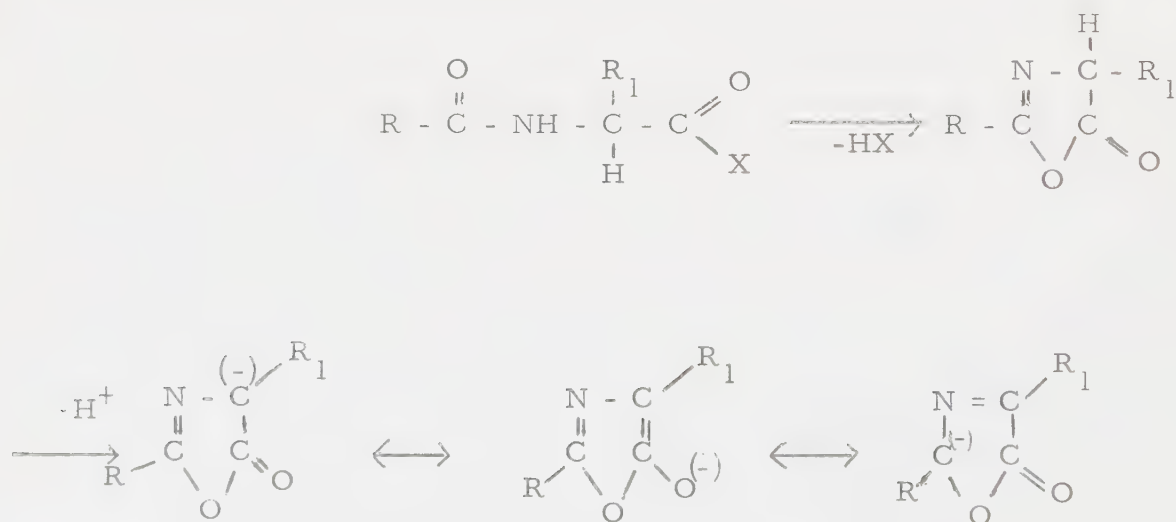
Les substituants électronégatifs en  $\beta$  (O et S de sérine et cystéine) facilitent le départ du proton, ces résidus sont en effet particulièrement sensibles à la racémisation basique.

- En milieu acide, on aurait plutôt addition d'un proton, la forme III précédente étant interdite :



Alors que les acides aminés eux-mêmes résistent généralement bien à la racémisation, certains de leurs dérivés y sont beaucoup plus sensibles; en particulier les radicaux électronégatifs portés par le carboxyle dans les composés activés facilitent l'ionisation initiale du carbone asymétrique, donc la racémisation.

Avec de tels dérivés, il est maintenant démontré que la racémisation rapide intervenant dans des conditions très douces, se produit par un troisième mécanisme: la formation d'une structure cyclique de type azlactone par perte des éléments de l'eau. Le carbone asymétrique de cette molécule s'ionise très facilement, l'anion formé étant stabilisé par formation d'un système de type aromatique (54).



Ce mécanisme donnant une racémisation rapide a lieu lorsque RCO- est un groupement protecteur acyle et surtout, un segment peptidique

N- protégé; une seule méthode de couplage, celle des azides, permet l'activation du carboxyle d'un peptide sans risquer la racémisation de son résidu C-terminal.

### 3) Tests de racémisation :

Les méthodes de protection et d'activation ont été testées sur des peptides simples (di, tri, et tétrapeptides) dont la pureté optique peut être contrôlée par des méthodes physiques ou enzymatiques (52):

- cristallisation fractionnée
- distribution à contre courant
- pouvoir rotatoire
- action de carboxypeptidase pancréatique, ne scindant que les liaisons peptidiques formées par les L-aminoacides, ou de la leucine aminopeptidase
- les méthodes chromatographiques permettent maintenant de séparer sur papier (55-56), sur couche mince et sur colonne (57) des dipeptides diastéréoisomères. On peut ainsi déterminer jusqu'à 0,1 % de racémique dans un dipeptide.

-Enfin, la chromatographie en phase gazeuse conduit à une séparation quantitative des dérivés N-trifluoroacétylés de dipeptides diastéréoisomères (57). Cette dernière méthode présente l'avantage de pouvoir tester, non seulement les méthodes d'activation, mais également d'autres groupes protecteurs, ceux-ci étant remplacés par le trifluoroacétyle après couplage.

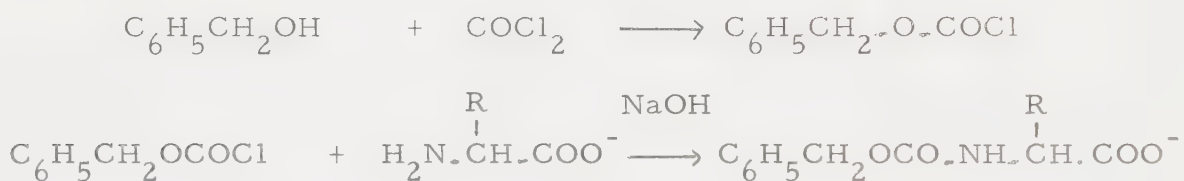
## IV - PROTECTION DE LA FONCTION AMINE.

Depuis une dizaine d'années, le choix des méthodes de protection et de déblocage de l'azote en  $\alpha$  du carboxyle, ou porté par les chaînes latérales des aminoacides basiques, s'est élargi considérablement.

### A) GROUPEMENTS ARYLOXYCARBONYLES , ANALOGUES SOUFRES.

C'est en 1932 que BERGMANN (48) introduisit le plus utilisé des groupements protecteurs en synthèse peptidique: le benzyloxycarboxyle ou carbobenzoxy (Z).

Les N-carbobenzoxy aminoacides sont préparés par action du chloroformiate de benzyle sur l'acide amino dans les conditions de SCHOTTEN-BAUMANN ; le chlorure est lui-même obtenu par action du phosgène gazeux, ou en solution toluénique sur l'alcool benzylique.



L'acidification précipite souvent le dérivé acide sous forme d'une huile, ou sous forme d'un produit cristallin, mal défini, de l'acide et du sel de sodium; on procède à l'extraction de l'acide qui est cristallisé ensuite dans un solvant organique. Malgré la difficulté quelquefois rencontrée pour initier la cristallisation, la purification par cette méthode s'opère ensuite aisément avec de bons rendements.

L'élimination de ce groupement est réalisée par hydrogénation catalytique (48), méthode particulièrement douce, donnant directement le produit peptidique libre, mais lente avec des chaînes importantes.



Depuis quelques années, l'acidolyse par l'acide bromhydrique anhydre dans l'acide acétique, le nitrométhane ou l'acétate d'éthyle est de

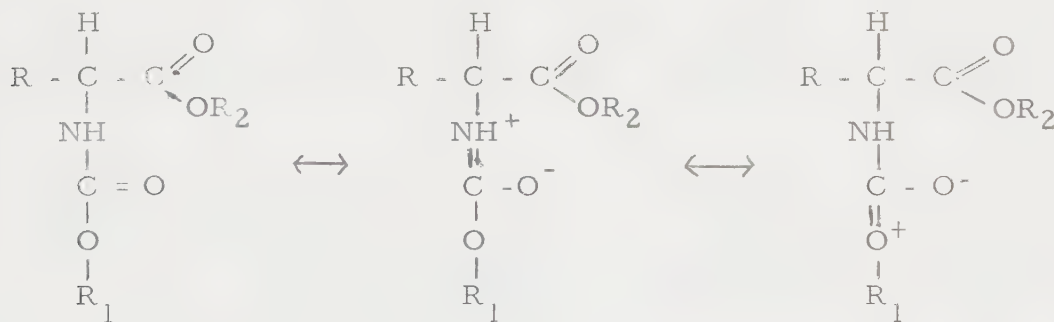
plus en plus utilisée (pour les peptides soufrés en particulier).



On peut également l'enlever par action de HBr liquide (58); l'acide trifluoroacétique n'opère la scission qu'à chaud en présence de phénol.

Enfin, la réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide (59) permet l'élimination du groupement carbobenzoxy, en même temps que de celle du groupement tosyl.

L'utilisation intensive des dérivés carbobenzoxyés s'explique essentiellement par leur résistance à la racémisation lors de l'activation, ceci serait dû aux formes mésomères possibles suivantes (54), empêchant l'ionisation du carbone asymétrique:



Des dérivés du groupement carbobenzoxy substitué ont été utilisés avec succès (60): p. nitro, p. chloro, p. méthoxy, p. phénylazo, p. méthoxyphénylazo-benzyloxy carbonyle; les amino acides ainsi protégés présentent l'avantage de cristalliser plus facilement, ou d'être visibles directement en chromatographie. Ils possèdent une sensibilité différente de celle du carbobenzoxy aux agents d'acidolyse ou d'hydrogénolyse: l'addition du méthoxyle facilite l'acidolyse, au contraire celle du groupement nitré facilite l'hydrogénolyse.

Le groupement benzhydryloxycarbonyle, introduit récemment (77) est beaucoup plus labile à l'action des acides: il s'enlève par l'acide trifluoroacétique ou HCl 4N dans l'acide acétique.

Les thioanalogues, (benzylthiocarbonyle et phénylthiocarbonyle) plus stables que les précédents vis à vis des acides, sont enlevés par oxydation avec l'acide perbenzoïque (51).



## B) GROUPEMENTS ALKOXYCARBONYLES

$$\begin{array}{c} \text{R}_1 \\ | \\ \text{Ces dérivés R-O-CO-NH-CH-COOH} \end{array}$$

où R est aliphatique ont été étudiés en 1957 par Mc KAY et ALBERTSON (61) avec R = cyclohexyl, cyclopentyl, diisopropylméthyl et tertio-butyl; ils ont d'abord été préparés par action des chloroformiates correspondants qui sont très peu stables.

Ils résistent à la réduction par l'hydrogène, mais sont scindés beaucoup plus facilement que leurs analogues aryliques par acidolyse (acide trifluoroacétique à température ordinaire).

Le plus utilisé de ces groupements est le tertio-butyloxycarbonyle (BOC) (où R =  $(\text{CH}_3)_3\text{C-}$ ) depuis que SCHWYZER et coll (62) en ont préparé les dérivés par action du tertio-butylazidoformiate stable, sur les aminoacides :



Le radical furfuryloxycarbonyle (63) semble également utilisable dans les mêmes conditions.

Un analogue soufré, le groupement éthylthiocarbonyle peut aussi être employé (64); il est éliminé par oxydation par l'acide perbenzoïque.

Le groupement 2.iodo éthoxycarbonyle ( $\text{ICH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$ ), dont les dérivés sont préparés par action du chlorure sur l'acide aminé serait scindé simplement par action du zinc dans le méthanol (65).

### C) GROUPEMENTS ACYLES

Contrairement aux dérivés précédents, les N-acyl aminoacides sont connus pour être sensibles à la racémisation, par formation d'un cycle azlactone.

Un certain nombre de ces dérivés sont cependant utilisables en synthèse peptidique, en tenant compte de ce danger dans le choix des méthodes de couplage, tels les groupements phthaloyle ou trifluoroacétyle (51) éliminés, le premier par hydrazinolyse, le second en milieu légèrement alcalin.

Le groupement formyle, connu depuis longtemps, a été largement utilisé ces dernières années, car il est éliminé par des méthodes variées: alcoololyse acide, hydrazinolyse, oxydation par  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou hydrogénolyse, et donne des dérivés très bien cristallisés (66).

### D) GROUPEMENT PARA TOLUENE SULFOYLIÉ ET ACTION DU SODIUM DANS L'AMMONIAC LIQUIDE.

Les dérivés N-tosylés des aminoacides sont obtenus par action du chlorure en milieu alcalin, avec de bons rendements; ils sont très bien cristallisés.

Déjà étudié par FISCHER (67), ce groupement n'a vraiment

pris de l'importance que lorsque DU VIGNEAUD découvrit qu'il était scindé par action du sodium dans l'ammoniac liquide (68).

Sa résistance aux agents de déblocage (acides, bases et hydrogène) le rend très utile pour la protection des chaînes latérales basiques ; notons que c'est le seul groupement protecteur supprimant totalement la basicité du groupement guanidine de l'arginine.

D'autre part, les dérivés tosylés racémisent difficilement, le sulfonamide agissant comme acide s'ionise en milieu alcalin, la charge négative ainsi apportée empêche l'ionisation du carbone asymétrique voisin(54). Actuellement, la seule méthode utilisée pour le scinder reste celle de DU VIGNEAUD. Au cours de cette réaction les produits secondaires sont le sulfite et le toluène, ainsi que le thiophénol en plus faible quantité (69).

Cette méthode de réduction a été utilisée avec succès pour de nombreuses synthèses (bradykinine, kallidine, vasopressines, ocytocine). Cependant, HOFMANN a indiqué que certaines liaisons peptidiques semblaient scindées au cours du traitement (segment C-terminal de MSH) (70).

Plusieurs auteurs ont donc fait des essais de libération par cette méthode sur des modèles peptidiques simples contenant de la proline (71) et ont conclu à la coupure de certaines liaisons (Lys-Pro en particulier) mais uniquement lorsqu'il y a apport d'acide protonique dans le milieu :  $H_2O$ ,  $CH_3COOH$ ,  $ClNH_4$ , généralement ajoutés en fin de réaction pour détruire l'excès de sodium.

Utilisant ces travaux, WICHEK et coll (72) ont mis au point une méthode de coupure sélective des chaînes peptidiques au niveau de l'azote de la proline, par action du sodium dans l'ammoniac liquide en présence de 10 à 15 équivalents de méthanol; alors qu'au contraire, RAMACHANDRAN (73) reprenait le déblocage de peptides apparentés au MSH, en milieu parfaitement aprotique, avec de bons rendements.

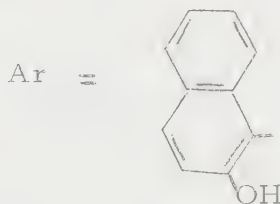
E) GROUPEMENTS DIVERS.

- Le groupement triphénylméthyle (trityle) (51) est introduit par action du chlorure de trityle; ses dérivés sont bien cristallisés: il est éliminé par acidolyse très douce ou par hydrogénolyse prolongée.

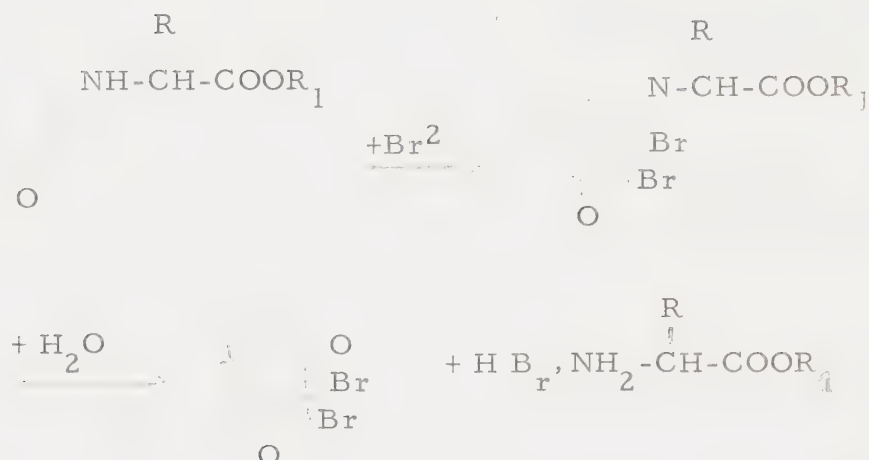
Il est à remarquer qu'avec les dérivés N-tritylés, les réactions de couplage peuvent être difficiles à cause de l'encombrement de ce groupement; de même, la saponification des esters d'acides aminés N-tritylés peut également être empêchée, cette propriété est utilisée pour obtenir les  $\alpha$ -monoesters des N-trityl amino diacides à partir des diesters correspondants.

- Certaines bases de SCHIFF ont également été étudiées, elles sont scindées en milieu acide très faible, mais la réactivité de la liaison C=N semble interdire leur utilisation avec de nombreuses méthodes de couplage.

Notons, parmi ces dérivés, les N-2 hydroxy arylidène aminoacides (74)



- Les dérivés de type èneamine sont également à l'étude pour être utilisés en synthèse peptidique; stables aux acides et aux bases, ils sont scindés par action du brome sur la double liaison, suivie d'hydrolyse par  $\text{H}_2\text{O}$ . Par exemple la 5-5-diméthylcyclohexane 1-3-dione (dimédon) (75) qui, avec un aminoacide, donne le dérivé N. protégé :



- Enfin le groupement O-nitrophénylsulfényle (NPS), plus labile que le groupement t. butyloxycarbonyle à l'action des acides peut également être scindé par simple passage sur colonne de nickel Raney dans un solvant organique (76).

## V - PROTECTION DE LA FONCTION ACIDE.

### A) SALIFICATION.

Avec certaines méthodes d'activation du carboxyle, il est possible de réaliser le couplage avec l'autre aminoacide simplement ionisé, sous l'action d'une base, ce qui revient à libérer le proton de la fonction amine.



Ceci est généralement réalisé en milieu aqueux en présence de soude ou de potasse à pH contrôlé; ou en milieu organique en présence d'une base tertiaire.

L'acidification suffit pour obtenir le composé libre.

## B) ESTERS METHYLIQUES ET ETHYLIQUES.

Toujours très largement utilisés (51), ces esters sont préparés par action de l'alcool, catalysée par HCl, ou mieux par  $\text{SOCl}_2$  ; on obtient ainsi le chlorhydrate de l'ester d'acide aminé; d'autres méthodes ont été préconisées, telle l'action du formiate ou de l'acétate d'éthyle, ainsi que la catalyse par des résines acides.

Ces esters sont facilement saponifiés par la soude dans le dioxanne, l'acétone ou l'alcool méthylique; mais ils subissent une aminolyse, ce qui conduit à des réactions secondaires gênantes lorsque la fonction amine de l'ester est libre.

## C) ESTERS BENZyliQUES ET DERIVES

Ces esters sont plus stables que les précédents, ils peuvent être scindés par hydrogénation catalytique (51).

Ils sont connus depuis longtemps, mais leur usage n'est devenu courant qu'avec la mise au point d'une méthode de préparation utilisant la distillation azéotropique avec, comme catalyseur, l'acide benzenesulfonique ou p. toluènesulfonique.

Les esters p. nitrobenzyliques sont plus résistants aux acides, alors que les esters anisyliques (p. méthoxybenzyliques) le sont moins.

L'ester benzyldéhydrique plus labile aux acides a été dernièrement préconisé pour la synthèse de peptides soufrés (77).

## D) GROUPEMENTS DIVERS

D'autres esters, stables en milieu alcalin et scindés en milieu acide, sont utilisés depuis quelques années (51): ester tertio-butyle, cyclopentyle, l'ester du N. hydroxyméthylphthalimide (78) est aussi

scindé par hydrazinolyse.

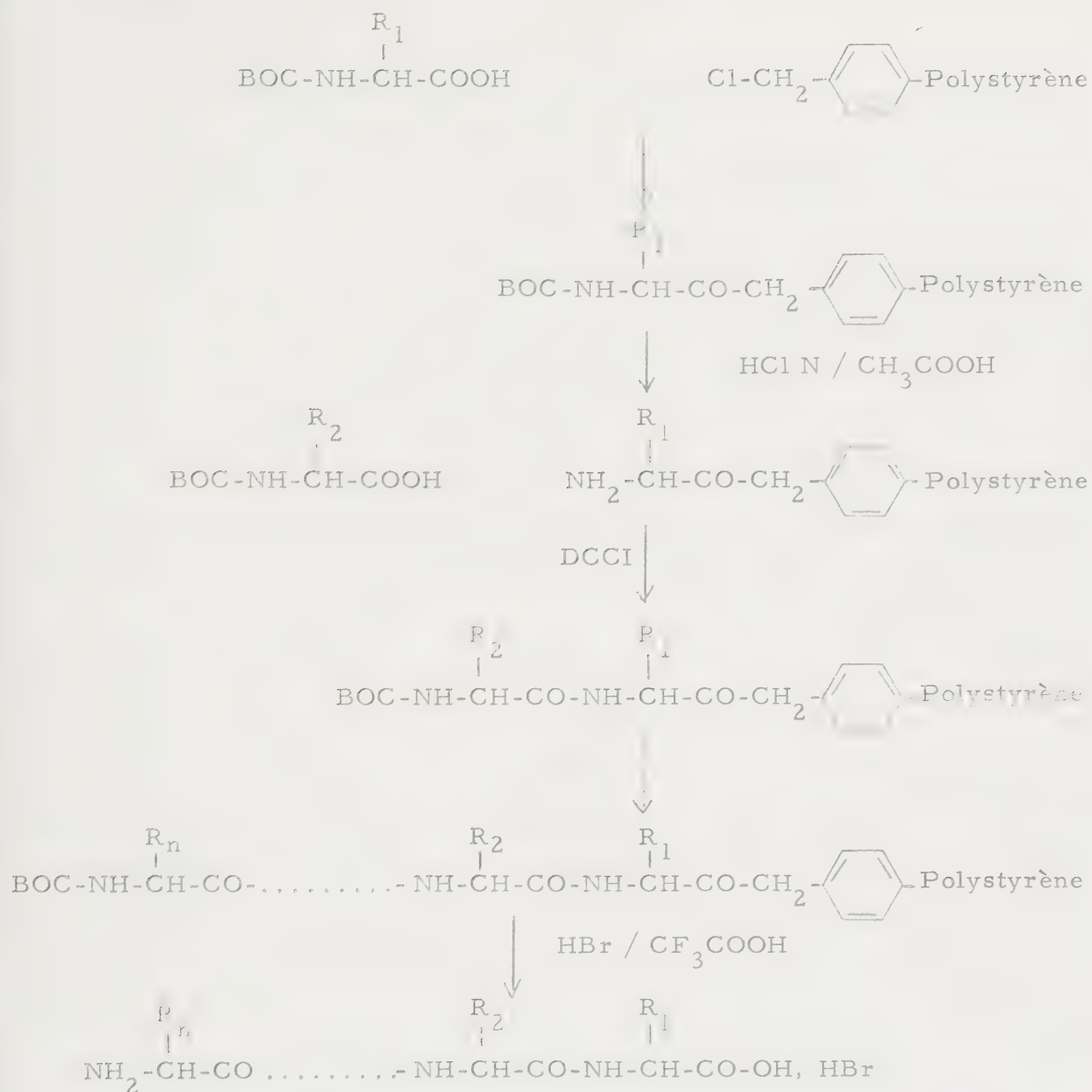
Les esters triméthylsilyliques (79) ainsi que les dérivés trialkylzinciques (80), très facilement coupés ont été essayés dernièrement comme protection du carboxyle.

Enfin, notons l'emploi d'hydrazides protégés servant de protection temporaire du carboxyle et pouvant être libérés pour donner l'hydrazide du peptide, lui-même transformé en azide pour effectuer un nouveau couplage.

#### E) ESTERIFICATION SUR RESINE: SYNTHESE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE.

Ces dernières années, le progrès le plus spectaculaire dans les techniques de synthèse peptidique a résidé en la mise au point de la synthèse dite en "phase solide" par MERRIFIELD (81) :

L'acide aminé C-terminal, sous forme de son dérivé N-t.butyl-oxycarbonylé est greffé sur une résine de polystyrène comportant des groupements chlorobenzyles. Le groupement protecteur est enlevé par acidolyse douce, et les couplages sont ensuite réalisés sur ce segment C-terminal totalement insolubilisé, par la méthode du dicyclohexyl carbodiimide, avec un excès de réactifs solubles. A chaque étape, des lavages abondants suffisent à la purification des produits intermédiaires. En fin de synthèse, une hydrolyse acide plus poussée détache la chaîne peptidique de son support.



L'identité de chaque étape de la synthèse par cette méthode a rendu possible leur automatisisation complète: la bradykinine est ainsi préparée en 32 heures seulement (82).

## VI - METHODES DE COUPLAGE.

Les composés riches en énergie, capables de former la liaison peptidique entre aminoacides ou peptides protégés dans des conditions douces, sont de deux types : ceux activant la fonction acide, de loin les plus utilisés et ceux activant la fonction amine.

D'une manière un peu arbitraire, on peut classer les composés à carboxyle activé en anhydrides mixtes et esters activés; il s'agit dans les deux cas de substitution de l'hydroxyle de la fonction acide par des radicaux plus électro négatifs, subissant facilement l'aminolyse; un troisième type d'activation du carboxyle étant réalisé par couplage direct, à l'aide de déshydratants organiques.

### A) ANHYDRIDES MIXTES

#### 1 - Avec un acide minéral.

Les chlorures d'aminoacides, introduits par FISCHER pour les premières synthèses, ne sont plus utilisés car ils causent une racémisation trop importante. De même les anhydrides mixtes avec l'acide sulfurique, l'acide phosphorique ou phosphoreux substitué proposés plus récemment, n'ont guère reçu d'applications (51).

Par contre, l'ancienne méthode des azides de CURTIUS (83), qui sont les anhydrides de l'acide azothydrique, a repris une importance nouvelle car c'est la seule méthode ne provoquant aucune racémisation lors du couplage de segments peptidiques entre eux.

Préparation : Les azides d'aminoacides ou de peptides N-protégés sont le plus souvent préparés par action de l'acide nitreux ( $\text{NaNO}_2$  en présence d'  $\text{HCl}$ ) sur l'hydrazide correspondant, lui-même obtenu par action de l'hydrazine sur l'ester méthylique ou éthylique.



Cette méthode classique a du être modifiée pour utiliser, sur la fonction amine du dérivé actif, des groupements protecteurs labiles en milieu acide; dans ce cas l'azide est préparé par action du nitrite de tertibutyle sur l'hydrazide, en milieu organique.

L'action de l'hydrazine, gênante dans certains cas (en particulier avec les groupements protecteurs de l'azote instables en milieu faiblement alcalin) peut être évitée en protégeant la fonction acide par un groupement de type  $-NH-NH-R$  ( $R$  = carbobenzoxy, trityl, t-butyloxycarboyle); la scission de  $R$  libère l'hydrazide à l'étape de la synthèse où l'on désire obtenir l'azide. On a également effectué la protection du carboxyle directement sous forme d'hydrazide en utilisant le sel d'isoxazolium comme réactif de couplage (84). Le principal inconvénient de cette méthode réside dans les réactions parasites ayant comme point de départ la transposition de CURTIUS des azides donnant le carbamate.



Celui-ci pouvant réagir avec le peptide à fonction amine libre pour donner un uréide, qui s'élimine difficilement.



Dans le cas de la sérine, le carbamate peut se cycliser avec l'hydroxyle en  $\beta$ , donnant une oxazolidone (85).



Ces réactions secondaires sont évitées en général, si l'on prend soin de maintenir l'azide à une température inférieure à 5°.

## 2 - Anhydrides mixtes avec les acides organiques.

Ils sont préparés par action du chlorure d'acide sur l'acide N-protégé, donnant un composé de formule :



Les premiers de ces composés ont été les anhydrides de l'acide benzoïque (51) avec  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5-$  ; mais ceux formés à partir de l'acide carbonique alcoylé ( $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$  ou  $(\text{CH}_3)_2\text{CH-CH}_2\text{O}-$ ), qui ne donnent comme produit secondaire de réaction que  $\text{CO}_2$  et l'alcool correspondant, ont été beaucoup plus largement employés.

Ces méthodes commodées sont toujours utilisées pour la synthèse de dipeptides, en effet une racémisation importante n'est évitée que dans le cas où le composé activé est un N-carbobenzoxy aminoacide .

## B) ESTERS ACTIFS

WIELAND et coll (86) ont, en 1951, utilisé les propriétés acylantes des thioesters d'acides aminés N-protégés vis à vis de la fonction amine, pour former la liaison peptidique; ces thioesters de formule :



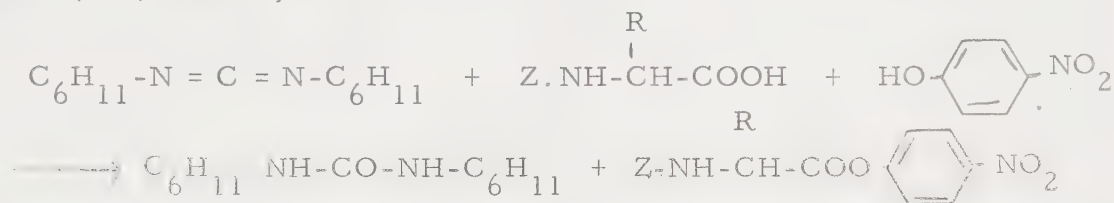
sont les premiers des composés dits "esters activés".

Plus utilisés, ont été les esters cyanométhyliques (87) préparés par action du chloracétonitrile sur l'acylaminoacide, de formule :



Mais la méthode des esters doit son succès aux esters p-nitro phéniliques introduits par BODANSZKY en 1955 (88). Les esters p-nitrophéniliques sont des solides stables, en général facilement cristallisés. La réaction de couplage avec les esters peptidiques a lieu, dans des solvants organiques variés, avec de bons rendements; elle peut également être réalisée avec les aminoacides ou peptides à fonction acide libre (simplement salifiée) en milieu aqueux, en présence de soude, à pH contrôlé, ou en milieu organique en présence de triéthylamine. (89).

Préparés d'abord par action de l'anhydride mixte d'acyl aminoacide sur le p-nitrophénol, ces composés sont maintenant obtenus soit par action du p-nitrophényl phosphite ou sulfite, soit par action de dicyclohexyl carbodiimide sur l'acide amino N-protégé et le paranitrophénol en excès (131). Leur symbole est : ONP.



Récemment LAW (90) a proposé l'action du N-trifluoroacétyl-imidazole comme agent déshydratant, pour les obtenir.

D'autres esters phéniliques substitués par des groupements électro négatifs ont été étudiés: esters du trichlorophénol, du p-phénylazo-phénol, du p-(4'chlorophénylazo)phénol (91), qui trouvent actuellement des applications.

Le couplage par la méthode des esters peut être considérablement accéléré par l'utilisation de catalyseurs de type acide-base facilitant leur aminolyse: tel le pyrazole ou l'imidazole (92). L'emploi de l'imidazole liquide comme solvant réactionnel permettant même l'activation des esters méthyliques normalement non réactifs (52).

Enfin, une nouvelle classe d'esters actifs est maintenant utilisée, dans laquelle l'activation du carboxyle est réalisée par les dérivés de l'hydroxylamine; les premiers en date sont ceux du N-hydroxyphthalimide (51)



Les esters du N-hydroxysuccinimide ont maintenant fait leurs preuves (93) et les recherches semblent se poursuivre activement pour trouver des dérivés actifs de ce type: esters de la 1-hydroxypipéridine et des dialkylhydroxylamines (94), de l'hydroxy-1-one-2 pyridine (95).

Ces dérivés permettent les couplages avec de bons rendements, avec ou sans protection de la fonction acide, mais certains provoquent la racémisation et ils semblent généralement plus difficiles à obtenir que les esters phénoliques.

### C) CCOUPPAGE EN UNE SEULE ETAPE.

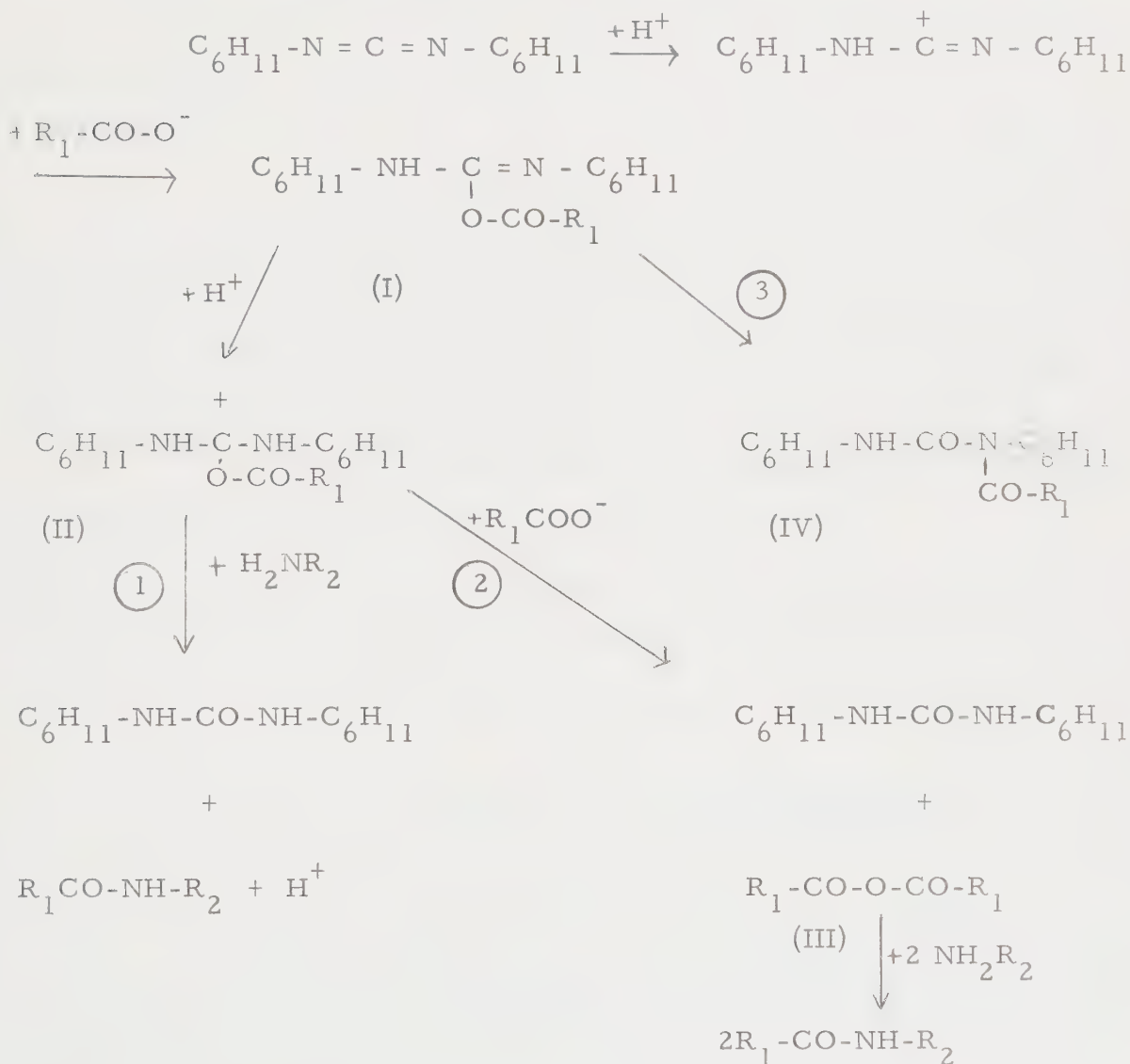
On peut, grâce à des composés organiques, éliminer directement les éléments de l'eau entre les fonctions acide et base libres pour former la liaison peptidique. Cette condensation directe simplifie la synthèse en supprimant l'étape de l'activation. En fait, le mécanisme réactionnel, comme nous le verrons, passe très certainement par l'intermédiaire d'un dérivé activé du carboxyle qui n'est pas isolé. Deux types de ces "réactifs actifs" sont maintenant utilisés: les composés insaturés et les dérivés des azoles.

#### 1 - Composés insaturés.

Les plus utilisés de ces agents de condensation sont les carbodiimides, et en particulier le dicyclohexylcarbodiimide (DCCI). Ce produit stable, a été introduit en synthèse peptidique par SHEEHAN et coll. en 1955

(96). Il donne comme produit secondaire de réaction au cours du couplage la dicyclohexylurée (DCHU) insoluble dans la plupart des solvants.

Au cours de la réaction, l'acide aminé ou peptide N-protégé  $R_1$ -COOH s'additionne sur le DCCI protoné pour donner un dérivé instable (I) qui est scindé par l'amine après une nouvelle protonation.



Une deuxième voie peut également conduire à la liaison peptidique: le dérivé II, réagissant avec une nouvelle molécule d'acide donne un

anhydride symétrique (III), qui est scindé par l'amine.

Une réaction parasite (3) ne peut toujours être évitée, c'est la transposition du dérivé (I) en uréide (IV); cette réaction abaisse le rendement de couplage et surtout, l'uréide obtenu, lorsque R<sub>1</sub> est une chaîne peptidique, ne peut être séparé du produit de réaction que très difficilement; le choix du solvant réactionnel (acétonitrile) limite la formation d'uréide.

Nous avons vu au paragraphe précédent l'emploi de DCCI pour la préparation des esters actifs. Dans ce cas, la formation d'uréide est limitée par l'emploi d'un excès de p. nitrophénol.

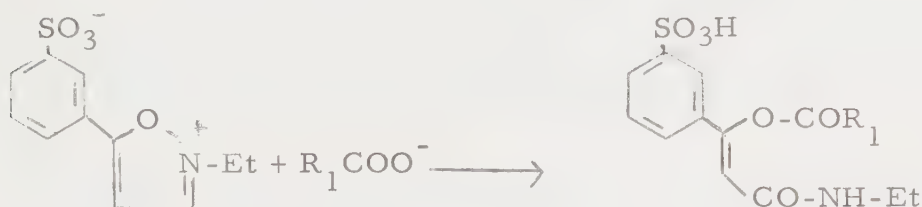
On a cherché à rendre les produits secondaires de la réaction de couplage solubles dans l'eau en utilisant des carbodiimides portant une fonction basique sur l'un des radicaux hydrocarbonés. Les sels de tels carbodiimides peuvent être utilisés en milieux aqueux; par exemple: N.éthyl.N' (3 diméthyl amino propyl)-carbodiimide (97).

D'autres composés insaturés ont également été essayés (51), réalisant le couplage direct entre fonction amine et acide, mais certains de ces composés donnent une racémisation importante au cours du couplage (98):



Un réactif maintenant commercialisé, introduit par WOODWARD (99) donne d'excellents rendements de couplage, ainsi que des produits facilement purifiés, les produits secondaires étant solubles dans l'eau :

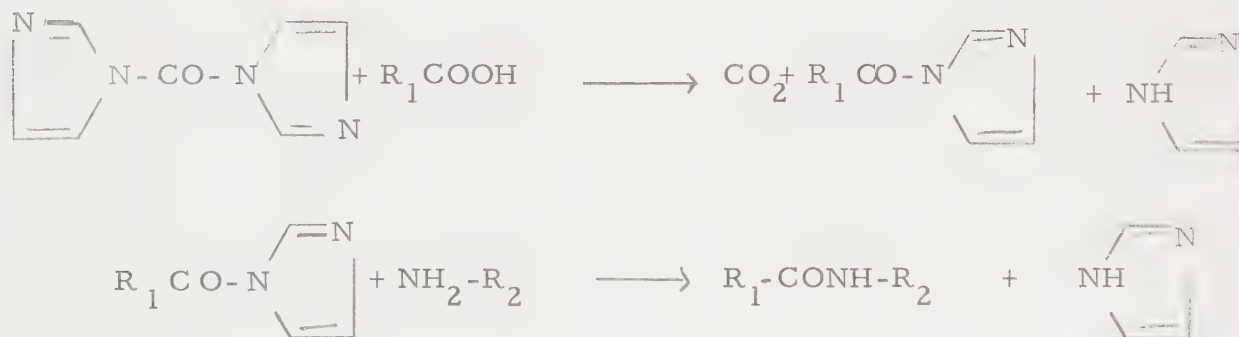
le N-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate, donnant avec la fonction acide un ester actif de type énolique, instable .



## 2- Azoles .

Nous avons vu que certains composés azoliques pouvaient être utilisés comme catalyseurs de réaction avec les esters actifs, certains dérivés azoliques sont également utilisés comme "réactifs activants" pour la formation de la liaison peptidique (52).

Le carbonyl diimidazole (52) donnerait avec la fonction carboxylique un dérivé intermédiaire de type "amide actif".



Le composé actif non isolé peut également être obtenu par action du thionyl diimidazole :



PAUL et ANDERSON (100) ont montré que le premier de ces composés donnait de bons résultats, quelquefois supérieurs à ceux du DCCI, dans la synthèse de dérivés de l'angiotensine.

Le triazole carbonyle a été également utilisé :



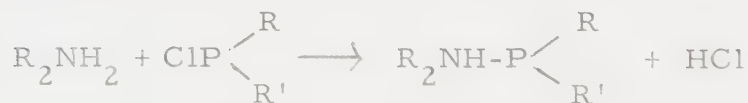
il réagit plus lentement que le précédent dans l'étape de l'activation, mais plus rapidement dans celle du couplage. (52).

#### D - ACTIVATION DE LA FONCTION AMINE

Le dernier mode de formation de la liaison peptidique utilise des dérivés actifs de la fonction amine, qui sont, soit des isocyanates (I) obtenus par action du phosgène, soit des amides de l'acide phosphoreux (II) (51).



I



II

La méthode des dérivés "phosphorazo" proposée par GOLDSCHMIDT (101) fait également intervenir un dérivé de type amide actif, obtenu par action du trichlorure de phosphore sur l'amine en solution dans la pyridine :



Ce dérivé réagit sur le partenaire acide ajouté ensuite à la solution pyridinique, donnant le produit peptidique et l'acide polymétaphosphorique comme produit secondaire.



Ce procédé a été utilisé pour préparer de nombreux dipeptides et tripeptides lorsque le problème de la racémisation n'intervient pas.



### CHAPITRE III

#### SCHEMAS DE SYNTHÈSE - PARTIE THÉORIQUE

##### INTRODUCTION

Nous avons vu que de nombreux analogues de peptides actifs ont déjà été réalisés par remplacement de l'arginine, en tenant compte soit de sa basicité soit de la géométrie du groupement guanidine.

Le remplacement des arginines aux extrémités de la chaîne de la bradykinine par d'autres amino acides basiques, permet de déterminer si le groupement guanidine lui-même est indispensable, ou si sa basicité seule joue un rôle prépondérant dans l'activité du peptide.

Au début de nos travaux, NICOLAIDES publiait, sans détails expérimentaux, la synthèse de la 1-lysine-bradykinine ainsi que celle de 1-ornithine-bradykinine (102), tandis que VOGLER et coll. avaient synthétisé la 1-9-acide diaminobutyrique-bradykinine (38).

Comme arginine et lysine paraissent avoir un rôle analogue dans les vasopressines naturelles, il semblait intéressant de remplacer l'arginine par la lysine ; c'est pourquoi nous avons entrepris la synthèse de la 1-9-lysine-bradykinine (peptide<sup>A</sup>) .

Au cours de nos recherches, la synthèse de ce peptide a été publiée par SCHRODER (103) en même temps que par WUNSCH (104) . Par ailleurs DE WALD préparait également la 9-histidine-bradykinine (105) .

Une autre particularité de la bradykinine est la présence de trois résidus prolyl dans sa chaîne, en 2, 3 et 7. On a remarqué que la présence de ce résidu influe sur la forme des molécules à la fois par sa structure cyclique rigide et par l'absence de l'hydrogène de la liaison peptidique. Ainsi, PERUTZ (106) fait remarquer que, dans la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine, le résidu prolyl forme les angles entre les segments hélicoïdaux de la molécule. La proline n'est cependant pas seule en cause puisque dans la chaîne  $\beta$  de la même protéine, elle se trouve remplacée par d'autres acides aminés. L'étude théorique de la torsion des chaînes peptidiques par le résidu prolyl ou hydroxyprolyl a été faite récemment (107).

Ces raisons nous ont incité à réaliser la synthèse d'analogues glyciniques de la 1-9-lysine-bradykinine, dans lesquels subsiste l'enchaînement des 3 résidus prolyl de la bradykinine et les 2 résidus basique terminaux : peptides B, C et D

Bradykinine : Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

Peptide A : (Lys) - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - (Lys)

Peptide B : (Lys) - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - (Gly) - (Lys)

Peptide C : (Lys) - Pro - Pro - Gly - (Gly) - (Gly) - Pro - Phe - (Lys)

Peptide D : (Lys) - Pro - Pro - Gly - (Gly) - (Gly) - Pro - (Gly) - (Lys)

Nous exposons dans ce chapitre, tout d'abord les méthodes qui nous ont servi dans les 4 synthèses : principes généraux de construction, protections, contrôle des produits (paragraphes I à IV), puis plus précisément chacun des schémas des 4 synthèses (paragraphes V à VIII).

## I - CONSTRUCTION DES CHAINES ET COUPLAGES

La construction des quatre chaînes peptidiques a été choisie en fonction des risques de racémisation. Nous avons hésité à employer, pour les chaînes complètes, la méthode récurrente partant de l'extrémité C-terminale. Cette méthode introduite par BODANSZKY et DU VIGNEAUD pour une synthèse de l'ocytocine (108) a d'ailleurs été utilisée par NICOLAIDES et DE WALD dans le cas de la bradykinine (109).

La présence du glycolle en position 4 nous a incité à préparer séparément les segments 1 - 4 et 5 - 9 de nos quatre peptides, qui peuvent être couplés par une méthode autre que celle de CURTIUS, sans risque de racémisation sur le carbone voisin du carboxyle activé; ce processus avait déjà été employé par GUTTMANN et coll. dans leur seconde synthèse de la bradykinine (110); par la suite, SIEMON (111) le reprit pour le même peptide ainsi que SCHRÖDER (103) et WÜNSCH (104) pour la 1-9-lysine bradykinine.

Cette construction nous permettait par ailleurs d'utiliser le même segment 1-4 pour les quatre peptides. Le glycolle présent de plus, dans les peptides B et D en position 8, et dans les peptides C et D en 5 et 6 a également été utilisé pour réaliser l'addition de segments peptidiques.

D'une manière générale, nous avons retenu la méthode des esters p-nitrophényliques pour les additions d'un seul résidu d'acide aminé, et celle de SHEEHAN par le dicyclohexylcarbodiimide pour la condensation de segments peptidiques; nous avons en effet constaté au cours de plusieurs essais préliminaires, que les esters p-nitrophényliques de peptides protégés n'étaient obtenus qu'avec de faibles rendements et difficilement purifiés.

## II - PROTECTION DES GROUPEMENTS AMINES

La présence du groupement  $\text{NH}_2$  dans la chaîne latérale de la lysine nous a imposé l'emploi de deux groupements protecteurs différents : l'un, pour le groupement  $\epsilon\text{-NH}_2$  de la lysine en 9, éliminé seulement en fin de synthèse, et l'autre, pour tous les groupements  $\alpha\text{-NH}_2$ , éliminé sélectivement à chaque étape.

Une synthèse de la bradykinine, antérieure à notre travail, utilisait le groupement tosyl pour bloquer la fonction guanidine de l'arginine en 9 (110); ce même groupement avait été utilisé dans le cas de la 1-9-acide diaminobutyrique bradykinine (38) ; il semble donc que, dans ce cas, le déblocage final par le sodium dans l'ammoniac liquide soit réalisable sans difficulté. C'est pourquoi nous avons choisi la tosylation de la lysine C-terminale, conjointement à la carbobenzoxylation de toutes les autres fonctions aminées; l'hydrogénolyse à chaque étape n'affectant aucunement le groupement tosyl, la réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide permettant, en fin de synthèse, l'élimination simultanée de tous les groupements protecteurs de l'azote.

Les synthèses de la 1-9 lysine bradykinine, publiées après le début de notre travail, ont par contre été réalisées en utilisant, soit le groupement t-butyloxycarbonyl (BOC), pour le  $\epsilon\text{-NH}_2$  de la lysine en 9 et le benzyloxycarbonyl (Z), pour les autres fonctions aminées (103), soit Z pour le  $\epsilon\text{-NH}_2$  de la lysine et BOC pour les autres fonctions (104).

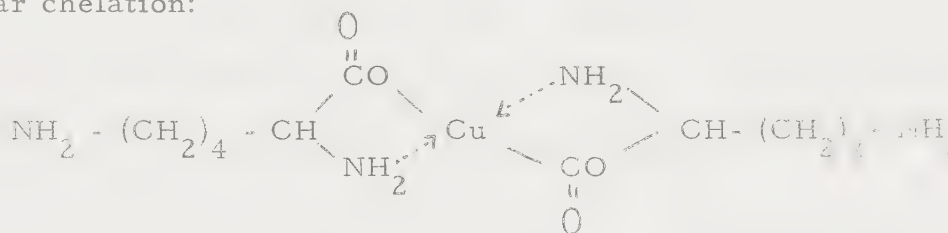
### N-Carbobenzoxyaminoacides :

Nous les avons préparés suivant la méthode classique, par action du chloroformiate de benzyle sur l'acide aminé en présence de soude; notons que dans le cas de la N - N $\epsilon$  -dicarbobenzoxyllysine, le pH doit être supérieur à 11. La cristallisation de ces dérivés nous a posé quelques problèmes, en particulier celle de la N - carbobenzoxyphénylalanine et de la N $\alpha$  - N $\epsilon$  -dicarbobenzoxyllysine rendue délicate par la précipitation d'un complexe métallique avec

l'ion sodium, lors de l'acidification à froid de la solution sodique (112-113); le composé doit donc être extrait par l'éther ou l'acétate d'éthyle et cristallisé en milieu organique; la  $N_{\alpha}$ - $N_{\epsilon}$ -dicarbobenzoxylisine n'a été obtenue qu'à l'état amorphe après séchage prolongé sous vide phosphorique.

Le chloroformiate de benzyle utilisé a été préparé à partir d'une solution toluénique de phosgène (114), plus facile à manipuler que le phosgène gazeux; ainsi préparé, le chlorure se conserve plusieurs mois à basse température.

$N_{\epsilon}$ -tosyl-lysine : A été obtenue suivant une méthode classique (115), utilisant le fait que, dans le sel cuivrique de la lysine, la fonction  $\alpha$ -aminée est bloquée par chélation:



Après tosylation, ce complexe est décomposé par  $H_2S$  pour libérer la  $N_{\epsilon}$ -tosyl-lysine.

### III - PROTECTION DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES

Nous avons réalisé un premier essai de préparation de la 1-9-lysine-bradykinine en salifiant simplement le  $COOH$  terminal. Cette méthode, inspirée de la 2<sup>e</sup> synthèse de la bradykinine de GUTTMANN (110) nous permettait d'isoler à chaque étape le peptide libre, mais nous limitait à la méthode des esters p-nitrophéniliques pour les couplages.

Nous avons alors repris la synthèse en protégeant la fonction acide de la lysine par méthylation. Facile à préparer, l'ester méthylique est peu stable, aussi n'avons-nous jamais cherché à isoler les esters à

fonction amine libre ; mais il nous laissait la possibilité, contrairement à l'ester benzylique, de libérer l'azote à chaque étape par hydrogénolyse.

Pour les autres analogues (B, C et D) la même protection du groupement acide de la lysine C-terminale a été utilisée. Par contre, pour le segment commun 1-4, nous avons largement employé la méthode des esters p-nitrophényles, en salifiant simplement les extrémités C-terminales.

#### IV - CONTROLE DE L'HOMOGENEITE DES PRODUITS OBTENUS

Un bon nombre des dérivés que nous avons obtenus ne sont que difficilement cristallisables et le point de fusion de ces produits amorphes est souvent mal déterminé, aussi leur homogénéité a-t-elle été contrôlée essentiellement par chromatographie et électrophorèse.

##### A/ Chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince de gel de silice est de plus en plus utilisée pour l'identification des amino-acides, peptides, et surtout dérivés peptidiques ; cette technique présente, par rapport à la chromatographie sur papier, les avantages de la rapidité et de la sensibilité.

##### Solvants :

Nous avons utilisé les solvants suivants (certains d'entre eux ont également été employés pour la chromatographie sur papier):

- (1) Benzène - isopropanol (80/20)
- (2) Benzène - isopropanol (50/50)
- (3) Méthanol-acétate d'éthyle (50/50)
- (4) Benzène - dioxanne - acide acétique (90/25/4)
- (5) Phénol - eau (75/25 g/g)
- (6) n-Butanol - acide acétique - eau (7/1/2)
- (7) n-Butanol - acide acétique - eau (4/1/1)
- (8) Méthyléthyl cétone - pyridine - eau (65/15/20)

- (9) n-Butanol - éthanol - eau - ammoniacque ( 4/4/1/1)
- (10) n-Butanol - éthanol - eau - dicyclohexylamine (10/10/5/2)
- (11) n-Butanol - méthanol - ammoniacque 34 % (50/20/30)
- (12) n-Butanol - pyridine - ammoniacque 34 % (50/20/30)
- (13) n-Butanol - acide acétique - pyridine - eau (30/6/20/24)

Alors que les dérivés totalement protégés des aminoacides et peptides migrent dans les solvants peu polaires comme benzène - acétate d'éthyle, il est souvent nécessaire, pour obtenir une migration correcte des acides peptidiques N-protégés d'utiliser des solvants polaires ; nous avons utilisé des mélanges de benzène et d'alcool, (solvants 1 à 4) ou encore benzène-dioxanne - acide acétique.

Enfin pour les aminoacides ou peptides libres, il est nécessaire d'utiliser un solvant aqueux, comme en chromatographie sur papier (solvants 5 à 13). Pour les nonapeptides terminaux, seuls les solvants alcalins nous ont permis une séparation correcte (solvant 11, 12 et 13).

Révélation : Les peptides sont révélés par la ninhydrine, et par l'isatine (116) pour ceux contenant la proline en position N. terminale. L'ensemble des dérivés possédant des fonctions amides est révélé par le chlore (117) ou par l'iode (118) plus commodément sur plaque que sur papier.

#### B/ Chromatographie sur papier

Dans certains cas, nous avons également utilisé la chromatographie sur papier Whatman n°1 pour contrôler les peptides libres à l'aide des solvants classiques (5 à 10), en révélant par la ninhydrine et par l'isatine.

#### C/ Electrophorèse

L'électrophorèse Haute Tension sur papier Whatman 1 a servi également au contrôle des peptides libres. Elle est réalisée sur appareil Pherograph sous une tension de 2000 à 3000 V pendant 1 heure avec divers tampons :

acide formique - acide acétique - eau (15/10/75) (pH 1,9)

acide acétique N (pH 2,3)

pyridine - acide acétique - eau (9/1/90) (pH 5,8)

acide citrique 0,05 M ;  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,05 M (pH 5,2)

véronal sodique - véronal (10,3 g/1,84 g pour 1 l. de solution) (pH 8,6).

Les révélations sont faites par la ninhydrine et par l'isatine.

#### V - PEPTIDE A :

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyL. phénylalanyl. séryl. prolyl. phénylalanyl.lysine.

Le schéma III résume la préparation de la 1-9-lysine bradykinine. Notre intention première était de synthétiser chacun des deux segments principaux par la méthode récurrente à partir des deux extrémités carboxyliques. Nous avons dû modifier ce schéma initial pour le segment 1 - 4 vu les faibles rendements de couplage du carbobenzoxyprolinate de p-nitrophényle avec la prolyl-glycine; par contre, le segment 5-9 a pu être préparé ainsi, à partir de la lysine C.terminale, seul le segment 5-6 a été ajouté par la méthode des azides

#### A/ N-Carbobenzoxyl. prolyl. prolyl. glycine

Z-Pro-Gly-OH (schéma I) a été préparé par action de l'ester Z-Pro-ONP sur le glycolle en milieu alcalin; plusieurs essais de couplage réalisés en présence de soude dans divers milieux hydro-organiques nous ont conduit à un produit difficile à cristalliser et à purifier. Nous avons préféré opérer en présence de triéthylamine, ce qui permet d'ajouter la base en quantité nécessaire au début de la réaction, et facilite la purification de l'acide peptidique, la base organique étant éliminée par évaporation. Les deux méthodes donnent dans ce cas, des rendements équivalents (65 % et 67 %).

L'hydrogénolyse du dérivé N. protégé conduit au dipeptide (II), avec de bons rendements, si le premier a été obtenu cristallisé; sinon, les

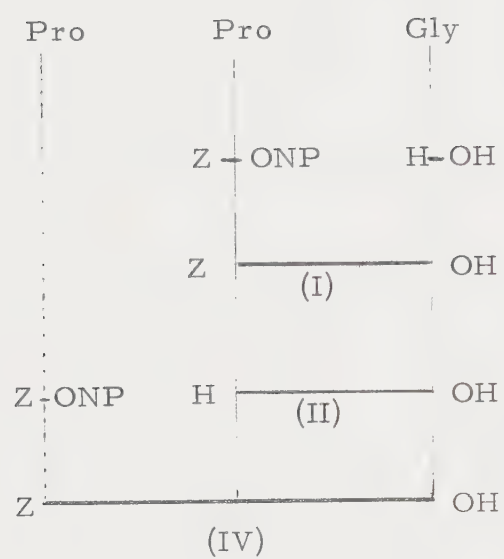


Schéma I

la rages répétés, en vue d'éliminer les produits bruns d'hydrogénation du p-nitro phénol abaissent considérablement le rendement de l'opération.

L'addition de Z-Pro-sur Pro-Gly par la méthode des esters p-nitrophényliques, en présence de soude ou de triéthylamine nous a permis d'isoler le tripeptide N. protégé (IV), mais avec des rendements très faibles (5 % à 30 %). Nous avons eu, par la suite, connaissance d'une remarque de JACQUENOUD (119) qui a également constaté que, dans certains cas, le groupement imine de la proline ne réagissait que lentement avec l'ester p-nitrophénylique (ainsi le couplage de Z-Arg (NO<sub>2</sub>)-Pro-ONP avec le glycolle est réalisé en 20 minutes en présence de soude, et en 5 heures avec Pro-Gly dans les mêmes conditions).

Dans ces deux cas, cette faible réactivité peut s'expliquer non par la nature même du groupement imine, puisque nous avons constaté que l'ester Z-Pro-ONP réagit normalement sur la proline dans les mêmes conditions, mais plutôt par un empêchement dû à la chaîne greffée sur le carboxyle (ici le glycolle). Elle explique nos rendements très faibles; l'isolement du produit de condensation étant, de plus, rendu délicat par la présence de produits secondaires en grande quantité.

Nous avons donc repris la synthèse du tripeptide N-protégé(IV) suivant le processus utilisé par GUTTMANN et coll. (110): couplage Z-Pro-Pro-OH (III) et de H-Gly-OEt par la méthode de SHEEHAN, suivie de la saponification de l'ester tripeptidique (schéma III).

Le dipeptide protégé (III) a lui-même été préparé avec de bons rendements (84 %) par action de l'ester Z-Pro-ONP sur la proline en présence de triéthylamine dans la pyridine pure. L'emploi d'un solvant non aqueux est ici rendu possible par la solubilité relative de la proline dans la pyridine.

#### B/ Prolyl. prolyl. glycine

Après hydrogénolyse du tripeptide N-protégé (IV) dans eau - méthanol et recristallisation dans éthanol 95 % - éther, la chromatographie

sur papier a révélé la présence de glyocolle à côté du peptide réagissant en bleu à l'isatine.

Pour effectuer des comparaisons chromatographiques, nous avons hydrogéné le dipeptide protégé Z-Pro-Pro-OH dans méthanol - eau, ce qui nous a donné un mélange de dicéto-2,5-dipyrrolidino pipérazine [Pro - Pro] et de dipeptide libre (136) révélés tous deux en chromatographie sur couche mince, le premier uniquement par l'iode, le second par l'iode, la ninhydrine et l'isatine.

Nous avons ainsi constaté, après révélation par ces trois réactifs la présence, dans le produit d'hydrogénation de (IV), de dicéto pipérazine [Pro - Pro] et non de dipeptide H-Pro-Pro-OH.

Par évaporation des liqueurs de cristallisation, nous avons obtenu cette dicétopipérazine ne donnant aucune réaction avec la ninhydrine ou l'isatine. Son hydrolyse par HCl 6 N 1 heure à 100° fournit la prolylproline, ainsi que la proline identifiées toutes deux par chromatographie sur papier en solvant: phénol - eau (75/25 g/g).

Nous avons donc conclu à la scission du tripeptide H-Pro-Pro-Gly-OH, certainement au cours de sa recristallisation, avec formation de dicéto pipérazine [Pro-Pro] et élimination du glyocolle.

De telles scissions, dues à la configuration du résidu Prolyl, avaient déjà été notées par RYDON qui avait étudié la formation de la dicétopipérazine [ProGly] par chauffage ou action de la triéthylamine sur l'ester tripeptidique H-Gly-Pro-Gly-OEt(144).

Nous avons, par la suite, eu connaissance d'une constatation de WÜNSCH (121) concernant la scission de Gly-Pro-Gly ainsi que de Pro-Pro-Gly, avec élimination de glyocolle, qu'il attribue à la présence d'eau dans le solvant de recristallisation.

Comme un essai d'élimination du groupement protecteur du tripeptide (IV) par action de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique,

effectué sur un échantillon chromatographique, ne semblait pas conduire à la scission du peptide, nous avons préféré réaliser l'hydrogénolyse de ce dérivé dans l'acide acétique glacial, la réaction est plus lente, mais le peptide est obtenu directement cristallisé par addition d'éther anhydre à froid.

Pendant la durée de notre travail, WÜNSCH (104) a procédé à l'hydrogénolyse de ce même dérivé dans l'alcool isopropylique en présence d'une faible quantité d'eau et a effectué de même, la cristallisation par l'éther à froid.

C/ N<sub>α</sub>-N<sub>ε</sub>-dicarbobenzoxyl lysyl. prolyl. prolyl. glycine

L'action de l'ester actif Z-Lys(Z)-ONP sur le tripeptide précédent (V), dans le mélange diméthyl formamide - eau, en présence de triéthylamine, nous a conduit au tétrapeptide protégé Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-OH (VI). Ce composé n'a été obtenu homogène en chromatographie que par malaxages répétés dans l'éther anhydre, ou, avec des rendements bien meilleurs, par passage sur silice: les impuretés (produits p-nitro phényles et Z-Lys(Z)-OH) sont d'abord éluées par l'acétate d'éthyle, le produit désiré l'est ensuite par le méthanol.

Le rendement de ce couplage, après purification, n'est que de 57 %.

Nous avons, au cours d'un essai préliminaire, par la méthode classique du DCCI, obtenu l'ester p-nitro phényle de ce composé tétra-peptidique. Les difficultés de purification, ainsi que les faibles rendements de l'opération (34 %) nous ont fait renoncer à l'utilisation de cet ester actif.

D/ Prolyl. phénylalaninyl. N<sub>ε</sub> tosyl lysine

Dans une première tentative, selon le schéma II, nous avons préparé ce tripeptide C-terminal H-Pro-Phe-Lys(Tos)-OH sans estérifica-

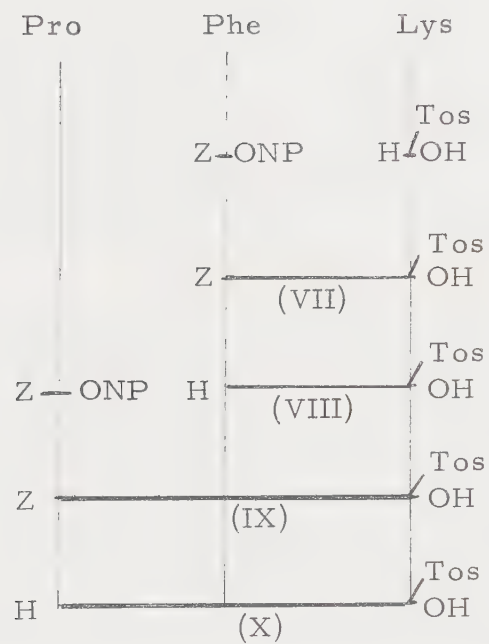


Schéma II

tion de la fonction acide C-terminale, les résultats des deux couplages qui nous y ont conduit, ont confirmé l'intérêt que présente une base tertiaire dans l'utilisation des esters actifs sans protection de la fonction acide.

L'action de Z.Phe.ONP sur H-Lys(Tos)-OH, le pH du milieu étant maintenu à 8,5 par addition de soude, nous a fourni le dipeptide N protégé avec des rendements de 42 % dans eau - dioxanne et 62 % dans eau-Pyridine.

Le même couplage, en présence de triéthylamine en excès dans le diméthyl formamide pur conduit au même produit avec un rendement de 83 %.

Par la même méthode, le dipeptide (VIII) obtenu par hydrogénolyse du dérivé précédent a été couplé avec l'ester actif Z-Pro-ONP pour donner l'acide tripeptidique (IX) avec un rendement de 86 %.

Le tripeptide tosylé (X) obtenu par hydrogénation de (IX) n'a pu être couplé avec l'azide Z-Phe-Ser-N<sub>3</sub>; les divers essais réalisés dans l'acétate d'éthyle ou le diméthyl formamide en présence de triéthylamine nous ont conduit à un mélange qui n'a pu être purifié ni par précipitation, ni par passage sur colonne de silice.

Aussi, avons-nous préféré reprendre la synthèse du pentapeptide C-terminal suivant le même principe de construction par récurrence, mais après estérification de la fonction acide de la N<sub>ε</sub>-tosyl lysine par le méthanol.



L'action de Z-Phe-ONP sur H-Lys(Tos)-OMe dans le chloroforme, en présence des ions Cl<sup>-</sup> du chlorhydrate neutralisé par la triéthylamine, conduit au dipeptide protégé (XI). Le second couplage, dans l'acétate d'éthyle réalisé immédiatement après hydrogénolyse de Z-Phe-Lys (Tos)-OMe, par action de Z-Pro-ONP sur la fonction amine libérée conduit au dérivé (XII).

Après cette opération, nous avons isolé une petite quantité de

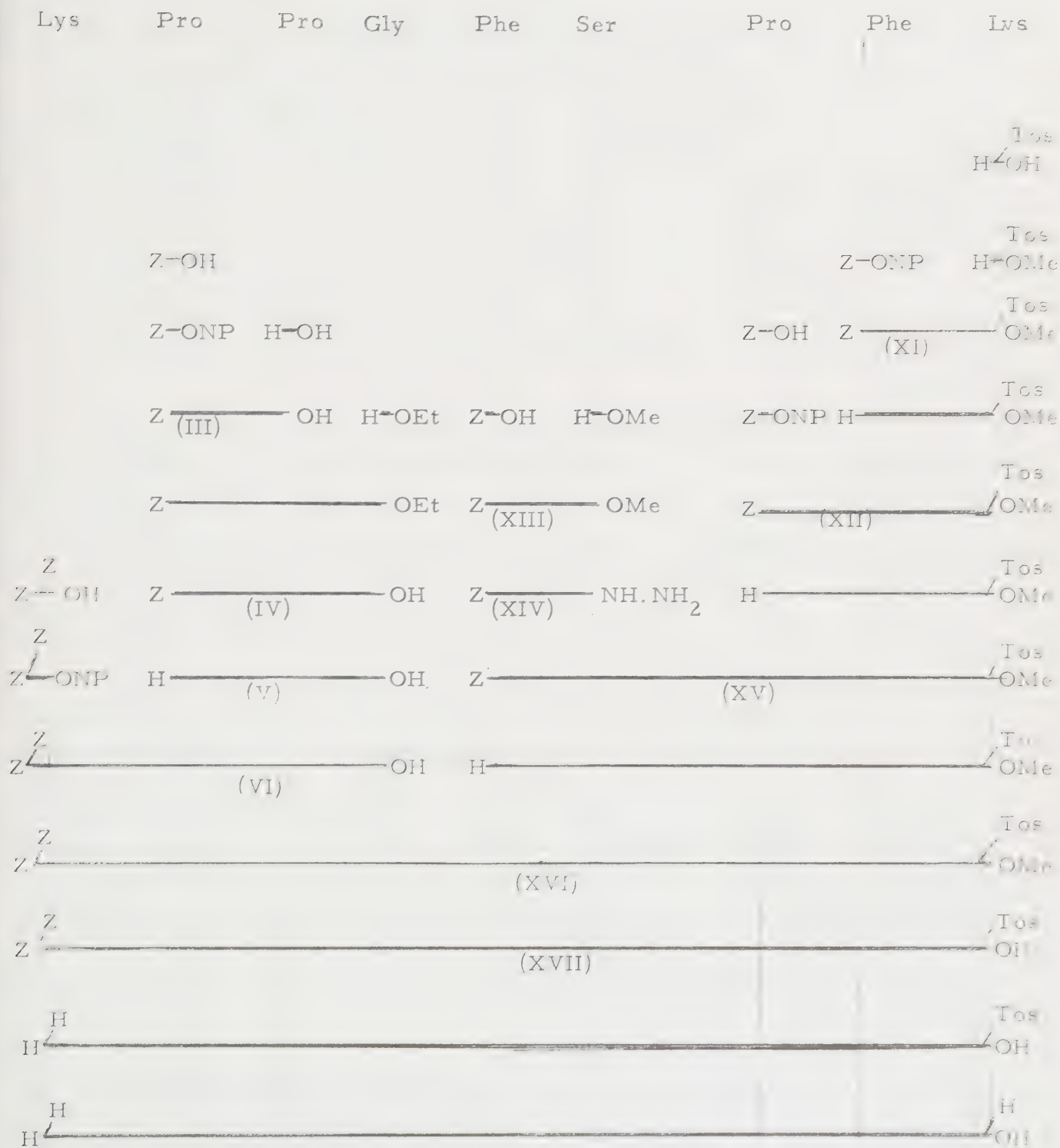


Schéma III : PEPTIDE A

produit secondaire, chromatographiquement identique à celui obtenu par chauffage du produit d'hydrogénolyse H-Phe-Lys (Tos)-OMe et dont l'hydrolyse par HCl donne de la phénylalanine, de la lysine (ainsi que de la N<sub>ε</sub>-tosyl-lysine) révélées par électrophorèse. Nous avons supposé qu'il s'agissait là du produit de cyclisation de H-Phe-Lys (Tos)-OMe.

SCHRÖDER, dans la synthèse de la 9-lysine-bradykinine(103), a par la suite, également signalé la formation de dicétopipérazine au cours du couplage de Z-Pro-OH sur H-Phe-Lys(BOC)-OMe par la méthode de SHEEHAN.

Nous avons repris, pour préparer Z-Phe-Ser-OMe (XIII) la méthode de SHEEHAN, utilisée par BOISSONNAS (120) pour ce même dipeptide. Un essai de couplage par action de Z-Phe-ONP sur H-Ser-OMe dans CHCl<sub>3</sub> nous a donné le même dipeptide avec un rendement de 52 % seulement, au lieu de 80 % dans la méthode précédente.

L'ester méthylique nous a conduit à l'hydrazide également obtenu par BOISSONNAS (120) par la méthode classique d'hydrazinolyse.

Pour isoler l'azide obtenu à partir de l'hydrazide précédent, nous avons préféré utiliser la technique employée par NICOLAIDES (109) pour ce même composé : extraction par l'acétate d'éthyle et lavages de la solution organique à 0° par une solution de NaHCO<sub>3</sub>. Le couplage avec H-Pro-Phe-Lys(Tos)-OMe obtenu par hydrogénation du dérivé N-Carbobenzoxylé(XII), est ensuite réalisé dans le diméthylformamide après évaporation de l'acétate d'éthyle à 0°; il conduit au pentapeptide protégé(XV) avec un rendement de 71 %.

#### F/ Dérivés nonapeptidiques

Le couplage terminal du dérivé VI et de celui obtenu par hydrogénolyse de XV a été réalisé par la méthode de SHEEHAN dans l'acétonitrile additionné du minimum de diméthylformamide pour obtenir la dissolution de l'un et l'autre partenaire.

La purification de ce dérivé nonapeptidique a d'abord été effectuée par lavages de la solution dans l'acétate d'éthyle, puis précipitation de la solution méthanolique par l'éther. Ce traitement n'est cependant pas suffisant pour supprimer totalement les impuretés révélées par le chlore en chromatographie sur plaque. Cet ester a cependant été saponifié tel quel par la soude dans l'alcool méthylique; nous avons dû employer deux fois la quantité théorique de base pour obtenir une réaction totale.

L'ester, comme l'acide nonapeptidique, a été obtenu sous forme amorphe, sans point de fusion déterminé.

L'action du sodium dans l'ammoniac liquide, sur l'acide nonapeptidique XVII, réalisée avec la quantité de sodium juste nécessaire à la réaction, nous a donné un produit brut que nous avons purifié par passages successifs sur colonne de Sephadex G. 10. Ce polymère donne, en principe, une séparation des molécules de poids moléculaire inférieur à 1000, les plus petites étant plus retenues que les grosses.

Cette méthode, jusqu'ici peu utilisée pour purifier les peptides de faible poids moléculaire, s'est avérée efficace pour éliminer le sodium de notre produit: l'acide acétique dilué élue d'abord les produits peptidiques récupérés quantitativement, et ensuite le sodium.

Par contre, la purification proprement dite, que nous avons réalisée par élution à l'eau, n'est complète que par passages répétés sur colonne, et avec un rendement médiocre en produit homogène par chromatographie sur couche mince et par électrophorèse. Les différences de  $R_f$  dues à la différence de poids moléculaire sont faibles (certaines impuretés pouvant provenir de la scission du peptide au cours du traitement par le sodium dans l'ammoniac liquide); par contre, la rétention des produits contenant de nombreux noyaux benzéniques semble plus marquée (122), c'est ainsi que les produits de déblocage incomplet sont éliminés facilement.

Les comparaisons chromatographiques et électrophorétiques avec des échantillons de 1-9-lysine-bradykinine fournis par le Dr. SCHRÖDER

(103) et le Professeur GRASSMANN (104), ont montré que, dans tous les cas notre produit a un comportement identique à celui des échantillons de référence.

Pour obtenir les données chromatographiques et électrophorétiques de la lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalanyl. séryl. prolyl. phénylalanyl. N $\epsilon$ -tosyl. lysine, nous avons effectué la décarbobenzoxylation par hydrogénolyse d'un échantillon de l'acide nonapeptidique XVII, le produit ainsi obtenu, présentant des traces d'impureté par chromatoplaque, n'a pas subi de purification.

#### VI- PEPTIDE B :

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalanyl. séryl. prolyl. glycyl. lysine.

Le processus résumé par le schéma IV nous a permis d'obtenir le peptide B. Il est parallèle à celui utilisé pour A, la seule différence réside en la préparation du tripeptide C-terminal.

La méthode récurrente, par les esters p-nitro phéniliques, utilisée pour Z-Pro-Phe-Lys (Tos)-OMe, nous a donné dans ce cas des produits huileux (Z-Gly - Lys (Tos)-OMe et Z-Pro-Gly -Lys (Tos)-OMe) qui n'ont pu être purifiés par précipitation.

Nous avons préféré utiliser le couplage direct de Z-Pro-Gly-OH sur H-Lys-OMe par la méthode de SHEEHAN. Le carboxyle réactif étant ici celui du résidu glycyl, les risques de racémisation sont supprimés.

Si ce mode de couplage permet d'éviter la cyclisation de l'ester dipeptidique H-Gly-Lys (Tos)-OMe sous forme de dicétopipérazine, il donne, par contre comme produit secondaire de la dicyclohexylurée substituée difficile à éliminer à ce stade. Le dérivé tripeptidique n'a pu être obtenu qu'à l'état amorphe par malaxages dans l'éther et séchage sous vide.

Les couplages suivants, réalisés dans les mêmes conditions

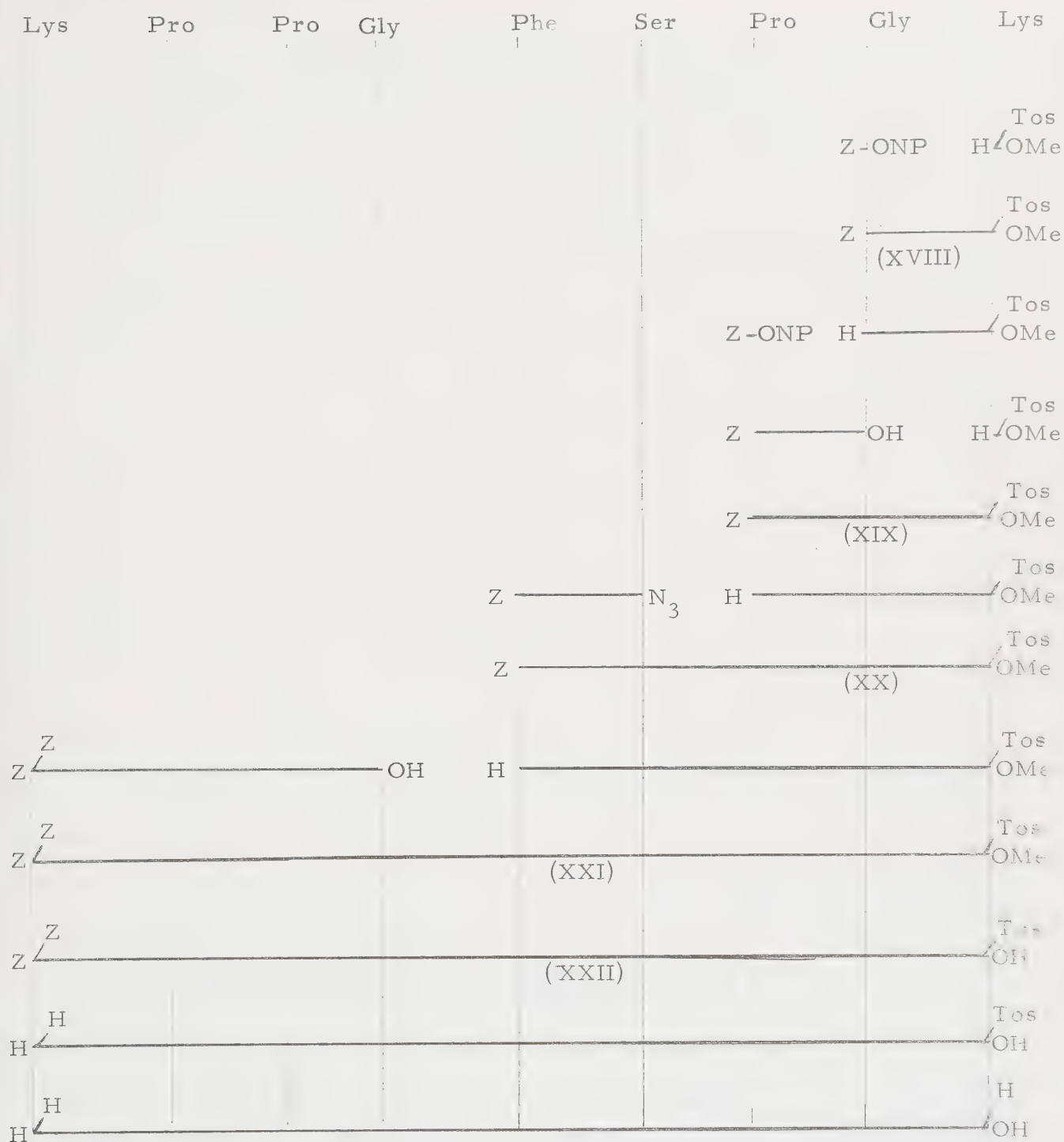


Schéma IV : PEPTIDE B

que pour le peptide A, nous ont conduit successivement :

-au pentapeptide protégé Z-Phe-Ser-Pro-Gly-Lys (Tos)-OMe (XX), par addition de Z-Phe-Ser-N<sub>3</sub> (Rendement 60 %)

-au nonapeptide (XXI) Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Gly-Lys(Tos)-OMe par la méthode de SHEEHAN (Rendement 70 %).

La saponification de ce dérivé, conduit à l'acide nonapeptidique XXII. Ces deux derniers composés, comme dans le cas du peptide A, ont été purifiés par précipitation de la solution méthanolique par l'éther anhydre, donnant des produits amorphes sans point de fusion déterminé.

Le déblocage de XXII par action du sodium dans l'ammoniac liquide, avec un léger excès de sodium (détruit en fin de réaction par quelques gouttes d'acide acétique), suivi de dessalification et purification sur Sephadex, a conduit au nonapeptide attendu avec un rendement de 17 %; une seconde opération, réalisée sans addition d'acide acétique, a conduit au même produit, avec un rendement de 31 %.

L'hydrogénolyse du produit protégé XXII a été réalisée pour obtenir les données chromatographiques et électrophorétiques du nonapeptide N<sup>ε</sup>-tosylé sur la lysine en 9, qui n'a pas été purifié.

## VII - PEPTIDE C

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. phénylalanyl. lysine

Nous avons repris tout d'abord l'ancienne méthode de FISCHER (ouverture de la dicéto-2, 5-pipérazine) pour préparer les dérivés di et tri-glyciniques (segment 4-6). Les résultats obtenus par ces méthodes étant médiocres, nous avons effectué la synthèse de Z-Gly-Gly-OH par la méthode plus classique des dérivés phosphorazo et repris le même schéma de synthèse que pour les peptides précédents (schéma V).

#### A/ Ouverture de la dicéto-2,5-pipérazine

Nous avons préparé la dicéto-2,5-pipérazine selon FISCHER(47), par cyclisation du glycinate d'éthyle, ou plus simplement par chauffage du glycolle dans l'éthylène glycol selon SANNIE (123).

Les essais d'ouverture du cycle pour obtenir le dipeptide, suivant les méthodes indiquées par FISCHER (47) ont été infructueuses : nous avons toujours obtenu le monomère en forte proportion.

Par contre, l'action du chlorure de l'acide chloracétique sur la dicéto-2,5-pipérazine en milieu alcalin, selon FISCHER (124), nous a permis d'obtenir la N-chloracétyl-glycyl-glycine avec un rendement de 20 %, elle-même transformée par action de l'ammoniaque en diglycyl-glycine.

Ce tripeptide directement carbobenzoxyté avec un rendement de 27 % nous a conduit ensuite à l'ester paranitrophénylique Z-Gly-Gly-Gly-ONP avec un rendement de 34 %.

#### B/ Synthèse du peptide C.

Abandonnant totalement la méthode précédente, nous avons préféré reprendre la synthèse suivant le schéma V.

La méthode des dérivés phosphorazo de GOLDSCHMIDT (101) nous a donné l'ester dipeptidique Z-Gly-Gly-OEt qui a été saponifié (rendement total des deux opérations 52 %).

Nous avons ensuite préparé le pentapeptide protégé XXV par deux voies différentes :

- action de l'ester p-nitrophénylique Z-Gly-Gly-ONP (39) sur l'ester tripeptidique terminal (le rendement de couplage est de 78 %), mais l'ester actif n'est obtenu qu'avec un rendement de 50 %.

- couplage des deux mêmes segments par la méthode de SHEEHAN (rendement 95 %.)

Pour effectuer le dernier couplage, nous avons d'abord hydrogéné le composé XXV dans le mélange méthanol-diméthyl formamide pour obtenir une dissolution suffisante du produit protégé et totale du produit d'hydrogénolyse; la réaction a ensuite été conduite comme dans le cas des peptides A et B (rendement 87 %), de même que la saponification, qui nous a donné l'acide nonapeptidique XXVII.

L'action du sodium dans l'ammoniac liquide sur ce dérivé XXVII, suivie de dessalification et purification sur Sephadex a donné le nonapeptide C, homogène en chromatographie et électrophorèse, avec un rendement total de 33 %; alors que l'hydrogénolyse donnait le peptide N<sub>ε</sub>-tosylé sur la lysine en 9, qui contient des traces d'une impureté révélées en chromatographie, et n'a pas été purifié.

## VIII - PEPTIDE D

### Lysyl-prolyl-prolyl-glycyl-glycyl-glycyl-prolyl-glycyl-lysine

La synthèse de ce dernier nonapeptide, résumée dans le schéma VI utilise le même tripeptide protégé C terminal Z-Pro-Gly-Lys(Tos)-OMe XIX que celle de B.

Il a été couplé après hydrogénolyse avec Z-Gly-Gly-OH par la méthode de SHEEHAN reconnue plus rentable que celle des esters p-nitro-phényles au cours de la préparation du peptide C, pour donner le dérivé XXVIII.

Contrairement aux autres composés pentapeptidiques C-terminaux, celui-ci n'a été obtenu qu'à l'état amorphe, sans point de fusion déterminé, par malaxage dans l'éther suivi de séchage.

Lys      Pro      Pro      Gly      Gly      Gly      Pro      Phe      Lys

Z-OH      H-OEt

Z ———— OEt  
(XXIII)

Z ———— OH      H ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OMe} \end{matrix}$   
(XXIV)

Z ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OMe} \end{matrix}$   
(XXV)

Z  $\begin{matrix} \text{Z} \\ \diagup \end{matrix}$  ———— OH      H ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OMe} \end{matrix}$

Z  $\begin{matrix} \text{Z} \\ \diagup \end{matrix}$  ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OMe} \end{matrix}$   
(XXVI)

Z  $\begin{matrix} \text{Z} \\ \diagup \end{matrix}$  ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{matrix}$   
(XXVII)

(1) H  $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \end{matrix}$  ————  $\begin{matrix} \text{Tos} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{matrix}$

(2) H  $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \end{matrix}$  ———— OH

Schéma V : PEPTIDE C

L'hydrogénolyse et la condensation avec Z-Lys (Z)-Pro-Pro-Gly-OH par le DCCI nous a conduit au nonapeptide protégé XXIX, isolé avec un rendement de 53 % seulement, que nous avons saponifié pour obtenir l'acide nonapeptidique XXX.

Dans un premier essai de déblocage de ce dérivé nonapeptidique XXX, le sodium en léger excès dans l'ammoniac liquide a été détruit par quelques gouttes d'acide acétique; nous avons obtenu alors un mélange de produits révélés à la ninhydrine, que nous n'avons pas réussi à séparer sur Sephadex.

Dans un deuxième essai, le sodium a été ajouté en quantité juste nécessaire. Après dessalification sur Sephadex, deux nouveaux passages sur colonne ont permis d'isoler le produit principal de réaction qui se trouvait mélangé à deux autres produits révélés à la ninhydrine en chromatographie, avec un rendement de 32 %.

L'hydrogénolyse de XXX a conduit au nonapeptide correspondant N $\epsilon$ -tosylé sur la lysine en 9, se trouvant mélangé à une impureté en quantité non négligeable révélée par électrophorèse; la séparation du produit principal de réaction n'a pu être réalisée que par électrophorèse préparative sur papier.

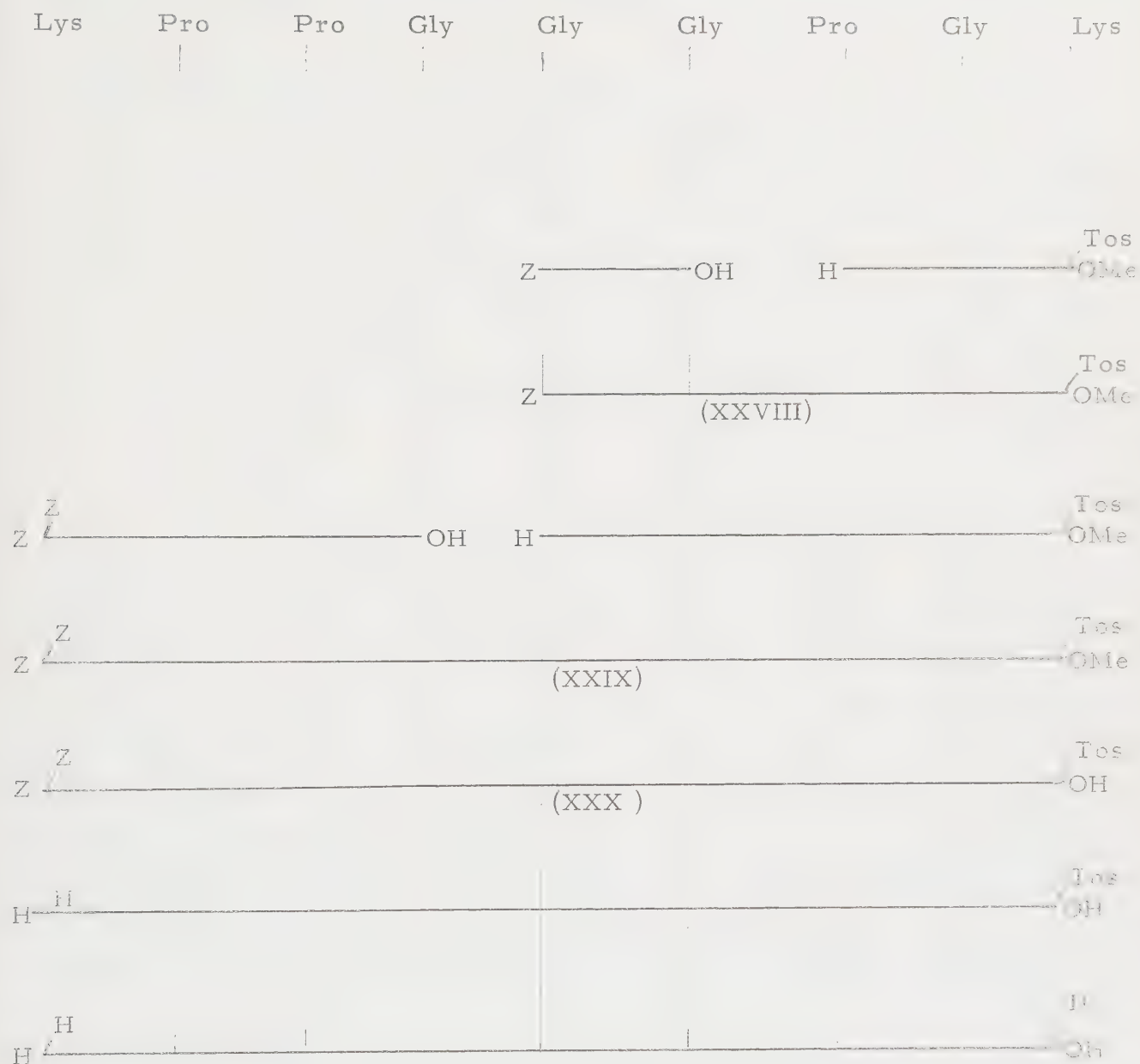


Schéma VI : PEPTIDE D

## CHAPITRE IV

### PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion sont pris au banc chauffant de KOFLER ; les évaporations sont conduites dans l'évaporateur rotatif, à une température inférieure à 30°.

Les Rf des chromatographies sur plaque et sur papier portent en indice le numéro du solvant utilisé, dont le tableau se trouve dans la partie théorique p. 56 ; les migrations électrophorétiques sont indiquées par rapport à celle de la lysine, les tampons utilisés sont également indiqués p. 58

Les analyses d'acides aminés ont été réalisées sur l'analyseur automatique BECKMANN, après hydrolyse par HCl 6N, à 100°, pendant 24 h.

#### I - DERIVES D'AMINOACIDES

##### Chloroformiate de benzyle

Il a été préparé par action du phosgène à 20 % dans le toluène sur l'alcool benzylique (114); l'excès de phosgène est chassé sous vide, puis la plus grande partie du toluène évaporé à une température ne dépassant pas

60°; le produit huileux légèrement jaune se conserve plusieurs mois au froid.

### Dérivés N-carbobenzoxylés d'acides aminés

Ils ont été préparés par action du chloroformiate de benzyle sur l'acide aminé, en présence de soude, dans les conditions de SCHOTTENBAUMANN, selon la méthode de BERGMANN et ZERVAS (48). Un lavage à l'éther élimine le toluène et le chloroformiate résiduel.

Après acidification à 0° jusqu'à pH 2, le produit précipité est extrait par l'acétate d'éthyle ou par l'éther; la solution organique est lavée par HCl N, H<sub>2</sub>O, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et évaporée.

|             | quantités<br>préparées | rendements | Réf. de la<br>technique<br>utilisée | F.      | F. Litt.                   |
|-------------|------------------------|------------|-------------------------------------|---------|----------------------------|
| Z-Phe-OH    | 48 g                   | 86 %       | 125                                 | 86°     | 88° (125)<br>86° (112)     |
| Z-Pro-OH    | 125 g                  | 90 %       | 126                                 | 76°     | 76° (126)                  |
| Z-Gly-OH    | 39 g                   | 91 %       | 114                                 | 120°    | 120° (114)                 |
| Z-Lys(Z)-OH | 54 g                   | 65 %       | 127                                 | 77°-78° | 80° (128)<br>88°-90° (129) |

### Dérivé N<sub>ε</sub>-tosylé de la lysine

Il est préparé par action du chlorure de tosylé sur le sel cuivrique de la lysine, le N<sub>ε</sub>-tosyl-lysinate de cuivre étant décomposé par H<sub>2</sub>S; d'après (115), la méthode n'ayant pas été modifiée.

- Quantité préparée: 56,4 g; Rendement par rapport à la lysine mise en oeuvre: 58 %

- F = 231° (déc.)      litt. F = 237-238°      (115)

### Esters méthyliques et éthyliques d'acides aminés

Les chlorures en sont préparés par action de l'alcool méthylique ou éthylique sur l'acide aminé en présence de HCl ou de chlorure de thionyle.

|                                                                         | Quantité préparée | Rendement | Réf. de la technique utilisée | F.       | F. Litt.  |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|-------------------------------|----------|-----------|
| H-Gly-OEt, HCl                                                          | 74 g              | 87 %      | 129                           | 144°     | 144°(129) |
| H-Ser-OMe, HCl                                                          | 14 g              | 93 %      | 128                           | 167-168° | 168°(128) |
| $\begin{array}{c} \text{Tos} \\   \\ \text{H-Lys-OMe, HCl} \end{array}$ | 43 g              | 80 %      | 130                           | 135°     | 135°(130) |

### Esters paranitrophényles des N-carbobenzoxy acides aminés

Ils ont été préparés par action du dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) sur l'acide aminé N-protégé et le paranitrophénol en excès de 20 % dans l'acétate d'éthyle ou l'acétonitrile (131).

|                                                             | Quantité préparée | Rendement | Réf. de la technique utilisée | F.               | F. Litt.                  |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|-------------------------------|------------------|---------------------------|
| Z-Phe-ONP                                                   | 38g               | 90 %      | 132                           | 126°             | 126,5 (132)<br>126° (133) |
| Z-Pro-ONP                                                   | 153 g             | 89 %      | 108                           | 94°              | 94-96°(108)               |
| Z-Gly-ONP                                                   | 15 g              | 88 %      | 134                           | 128°             | 127,5-128,5°<br>(134)     |
| $\begin{array}{c} \text{Z-Lys-ONP} \\ \text{Z} \end{array}$ | 43 g              | 77 %      | 135                           | 61°<br>(éthanol) | 63° (136)<br>61-62°(135)  |

## II - METHODES GENERALES

### 1- Couplages par esters par anitrophényliques

#### A - Fonction acide estérifiée

1) Le chlorhydrate d'ester est dissous dans  $\text{CHCl}_3$  en présence de triéthylamine, on ajoute l'ester actif en quantité équivalente, en solution dans  $\text{CHCl}_3$  ; le mélange est agité 2 à 3 jours à température ordinaire.

On chasse ensuite le solvant, et le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, le chlorhydrate de triéthylamine est filtré et lavé à l'acétate d'éthyle; les filtrats, lavés par une solution de  $\text{NaHCO}_3$ , par  $\text{HCl}$  0,5N, puis par  $\text{H}_2\text{O}$  sont séchés sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , et évaporés.

Le produit est recristallisé dans un solvant approprié après séchage sous vide.

2) L'ester à fonction amine libre, obtenu par hydrogénolyse du dérivé N-carbobenzoxylé, est dissous dans l'acétate d'éthyle, on ajoute l'ester actif en quantité équivalente; le mélange est agité à une température inférieure à  $35^\circ$  jusqu'à fin de réaction.

Après refroidissement, le précipité est filtré, lavé à l'éther et recristallisé dans un solvant approprié.

3) Si le produit de réaction ne précipite pas, la solution est lavée par  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  0,5 N, séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporée. Le résidu séché sous vide, est malaxé dans l'éther anhydre jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent.

4) L'action de l'ester actif sur l'ester peptidique à fonction amine libre est réalisée dans le diméthylformamide (DMF); le solvant est ensuite évaporé à sec et le résidu cristallisé par addition d'éther anhydre.

B - Fonction acide non estérifiée, réaction en présence de NaOH

1) L'acide est mis en solution dans le mélange pyridine-eau (1/1), et le pH ajusté à 8,5 par addition de NaOH 2N dans le même solvant; l'ester actif est alors ajouté par petites portions dans le mélange agité énergiquement à température ordinaire et s'y dissout lentement, le pH étant maintenu constant par addition de soude.

Lorsque l'ester actif est entièrement dissous et que la consommation de soude a cessé, la solution est diluée par 4 volumes d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  et lavée à l'acétate d'éthyle jusqu'à disparition de la coloration jaune.

Le produit de réaction est alors précipité par acidification à froid par HCl 4N jusqu'à pH 2, puis filtré ou extrait par l'acétate d'éthyle.

2) Même méthode que B<sub>I</sub>, le solvant réactionnel étant dioxane-eau (2/1).

3) Solvant réactionnel: acétone-eau (2/1); dans ce cas, l'acétone est évaporée sous vide après réaction, et la solution simplement diluée par un égal volume de  $\text{NaHCO}_3$ , avant lavage à l'acétate d'éthyle.

C - Fonction acide non estérifiée, réaction en présence de triéthylamine ( $\text{Et}_3\text{N}$ )

1) L'ester actif est mis en solution dans le mélange DMF-eau (1/1) ainsi que l'acide ou le peptide, en présence de 3 fois la quantité moléculaire de  $\text{Et}_3\text{N}$ .

La réaction est réalisée à température ordinaire, puis terminée par chauffage à 35°. La solution est alors diluée par 3 volumes d'une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , lavée à l'acétate d'éthyle jusqu'à disparition de la coloration jaune, acidifiée à froid par HCl 4N, jusqu'à pH 2; le pré-

cipité ainsi obtenu est filtré ou extrait à l'acétate d'éthyle.

2) Les mêmes opérations que précédemment sont réalisées, le solvant réactionnel étant la pyridine pure; dans ce cas, l'acide ne se dissout complètement qu'au cours de la réaction.

3) Même méthode, le solvant réactionnel étant le DMF pur.

## 2 - Couplages par le dicyclohexyl carbodiimide (DCCI)

### A - Avec un chlorhydrate d'ester d'acide

Le chlorhydrate d'ester d'acide est mis en suspension dans l'acétonitrile et dissous par la quantité équivalente de triéthylamine, on ajoute l'acide peptidique ; la solution est refroidie à  $-10^{\circ}$  et additionnée de DCCI en quantité équivalente.

La réaction est menée à  $0^{\circ}$  avec agitation, et terminée à température ordinaire ; la dicyclohexylurée est filtrée, lavée à l'acétate d'éthyle, les filtrats sont évaporés et le résidu repris dans l'acétate d'éthyle, le chlorhydrate de triéthylamine est filtré et lavé à l'acétate d'éthyle, les filtrats rassemblés sont lavés par  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  0,5 N,  $\text{H}_2\text{O}$ , et séchés sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  avant d'être à nouveau évaporés à sec. Le résidu est malaxé dans l'éther anhydre, puis séché sous vide.

### B - Avec un ester peptidique à fonction aminée libre

1) L'ester peptidique obtenu par hydrogénolyse du dérivé N-carbobenzoxylé correspondant est mis en suspension dans l'acétonitrile ainsi que le peptide N-protégé en quantité équimoléculaire, on ajoute la quantité de DMF nécessaire pour obtenir la dissolution totale des deux produits.

Le mélange est refroidi à  $-10^{\circ}$  et l'on ajoute la quantité théorique de DCCI ; la réaction est réalisée à  $0^{\circ}$  avec agitation, et terminée à

température ordinaire.

La dicyclohexylurée est filtrée, lavée par une petite quantité de DMF ; les filtrats rassemblés sont tiédés à  $50^{\circ}$  et dilués par  $H_2O$  jusqu'à début de trouble, le produit cristallise par refroidissement, est filtré, séché et purifié par recristallisation.

2) Les filtrats obtenus comme précédemment sont évaporés à sec, le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, la solution lavée par  $NaHCO_3$   $H_2O$ ,  $HCl$  0,5N (ou acide citrique 10 % dans le cas des dérivés nonapeptidiques), à nouveau par  $H_2O$  et enfin par une solution saturée de  $NaCl$ , on sèche sur  $Na_2SO_4$  avant d'évaporer à sec.

### 3 - Couplage par la méthode des azides

L'hydrazide, en solution dans l'acide acétique glacial, est refroidi à  $-10^{\circ}$ , on le traite par un excès de 20 % d' $HCl$  2N et  $NaNO_2$ , en solution dans un peu d'eau, en agitant. Après 15 m à  $0^{\circ}$ , la solution est diluée par 4 fois son volume d'eau glacée; l'azide est extrait 3 fois par l'acétate d'éthyle, et la solution organique est lavée par une solution de  $NaHCO_3$  jusqu'à ce que la liqueur de lavage reste alcaline, puis séchée sur  $MgSO_4$  (toutes ces opérations se font à  $0^{\circ}$ , avec des solutions préalablement refroidies).

Cette solution est ajoutée à celle de l'ester peptidique dans le DMF, également refroidie, l'acétate d'éthyle est évaporé à température inférieure à  $4^{\circ}$  ; le mélange réactionnel est alors agité 24 h à  $0^{\circ}$ , et 36 h à température ordinaire ; le solvant est chassé complètement, et le résidu traité pour purification.

### 4 - Saponification des esters méthyliques et éthyliques

L'ester du peptide N-protégé en solution dans le méthanol est saponifié pendant 2 h, à température ordinaire, par 2 fois la quantité théorique de  $NaOH$  N ; on dilue ensuite la solution par 2 à 3 volumes d'eau, et l'on

évapore l'alcool. Un léger précipité, qui peut alors se former, est filtré et la solution aqueuse, refroidie à 0°, est acidifiée par HCl N (ou par l'acide citrique 10 % dans le cas des nonapeptides) jusqu'à pH 2-3, pour précipiter l'acide peptidique.

## 5 - Hydrogénation des dérivés peptidiques N-carbobenzoxylés

### A- Peptides à fonction acide libre

1) Le peptide N-carbobenzoxylé, en solution dans un mélange eau-méthanol ou eau-méthanol-acide acétique, est hydrogéné en enceinte fermée, à la pression atmosphérique, en présence de Pd sur charbon ; le CO<sub>2</sub> dégagé est absorbé dans un deuxième récipient en communication avec la fiole à hydrogénation et contenant une solution de soude concentrée.

La réaction est contrôlée à la fois par l'absorption d'hydrogène qui cesse en fin de réaction, et par chromatographie sur couche mince avec un solvant permettant une chromatographie rapide : benzène-dioxanne-acide acétique (90/25/4) ou benzène-isopropanol (80/20); révélation par la ninhydrine et par le chlore, et en U. V. avec le gel G<sub>254</sub>.

En fin de réaction, le catalyseur est filtré, lavé à l'eau ou à l'acide acétique dilué, le filtrat est évaporé à sec et le résidu cristallisé dans un solvant approprié.

2) Le peptide N-carbobenzoxylé, en solution dans l'acide acétique glacial, est hydrogéné comme précédemment ; après élimination du catalyseur, la solution acétique est précipitée dans 5 fois son volume d'éther anhydre avec agitation pour éviter la prise en masse du produit ; le peptide cristallise rapidement, le précipité filtré est lavé à l'éther et séché sous vide.

### B- Peptide à fonction acide estérifiée

L'ester peptidique N-carbobenzoxylé en solution ou partiellement

dissous dans l'alcool méthylique est hydrogéné comme précédemment ( la dissolution totale intervenant rapidement au cours de l'hydrogénolyse).

En fin de réaction, le catalyseur est filtré et lavé à l'alcool méthylique, le filtrat est alors évaporé à une température inférieure à  $30^{\circ}$  et le résidu séché sous vide avant d'être repris dans le solvant réactionnel, pour le couplage suivant.

#### 6 - Décarboboxylation par HBr dans l'acide acétique

La solution acide est préparée par addition, goutte à goutte, de 10 g d'acide bromhydrique azéotropique fraîchement distillé à 300 g d'anhydride acétique refroidi à  $-10^{\circ}$ , et laissé ensuite 24 h à température ordinaire, ce qui donne une solution d'acide bromhydrique environ 1,7 N dans l'acide acétique.

L'échantillon de peptide N-protégé est mis en solution dans le mélange précédent et laissé 2 h à température ordinaire, la solution est ensuite évaporée à sec, le résidu repris plusieurs fois dans l'eau et évaporé à sec à chaque fois, puis chromatographié.

#### 7 - Action du sodium dans l'ammoniac liquide

1) Le nonapeptide N-protégé est mis en solution dans  $\text{NH}_3$  liquide fraîchement distillé sur sodium. Avec agitation, on ajoute le sodium par petits fragments, jusqu'à obtention d'une coloration bleue persistante ; on ajoute alors quelques gouttes d'acide acétique pour faire disparaître la coloration; on laisse  $\text{NH}_3$  s'évaporer, le résidu est gardé 2 h sur  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et NaOH, repris dans l'acide acétique 0,1 N, et passé sur colonne de Sephadex.

2) L'addition du sodium est réalisée en plongeant dans la solution un fragment accroché à l'extrémité d'un agitateur; l'enceinte ne restant en communication avec l'atmosphère que par un tube à  $\text{CaCl}_2$ ; lorsque la coloration bleue persiste 30 secondes, le sodium est définitivement retiré de la

solution; la couleur bleue disparaît d'elle-même en quelques minutes.

## 8 - Purification sur Sephadex

La purification de chacun des quatre nonapeptides a été réalisée par passages répétés sur colonne de Sephadex G-10

1°/ Le produit de réaction, en solution dans 10 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 0,1 N, est passé sur une première colonne (D = 2,5 cm; L = 45 cm); éluant : acide acétique 0,1 N; les fractions de 3 cm<sup>3</sup> recueillies sont contrôlées :

- Par dépôts de 1 µl sur papier et révélation par la ninhydrine
- A la flamme pour déceler le sodium.

Une deuxième opération identique est reprise sur les fractions contenant du sodium.

Les fractions de ces deux opérations, révélées par la ninhydrine et exemptes de sodium, sont rassemblées, évaporées à 10 cm<sup>3</sup> environ et lyophilisées.

2°/ Ce produit brut est redissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau et passé sur une deuxième colonne (D = 2,5 cm; L = 100 cm); éluant : eau distillée. Les fractions de 6 cm<sup>3</sup> sont contrôlées comme précédemment par la ninhydrine, puis par chromatographie sur plaque. Les fractions homogènes sont rassemblées, partiellement évaporées et lyophilisées.

III - PEPTIDE A -N-carbobenzoxy. prolyl. glycine: Z-Pro-Gly-OH (I)

## A) Couplage en présence de NaOH

1) 0,75 g de glyocolle (10mM) et 3,70 g (10 mM) de Z-Pro-ONP traités suivant la méthode B<sub>1</sub> ont donné un produit huileux, extrait à l'acétate d'éthyle, séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporé à sec, qui n'a pu être obtenu cristallisé:

Poids = 2,14 g                      Rendement = 70 %

Ce produit n'a pas subi de purification plus poussée avant l'hydrogénolyse qui a donné le dipeptide libre, difficilement purifiable par recristallisation dans l'éthanol 95° avec un rendement de 23 % par rapport au glyocolle et à l'ester actif mis en oeuvre.

2) Par la méthode B<sub>2</sub>, on a également obtenu un produit qui n'a pu être cristallisé, avec un rendement de 55 % en peptide libre, après hydrogénolyse.

3) Par la méthode B<sub>3</sub>, obtention d'un produit huileux traité comme précédemment, qui est devenu pulvérulent par malaxages répétés dans l'éther de pétrole.

Recristallisé dans acétate d'éthyle-éther de pétrole (1/1) sous forme de fines aiguilles blanches .

- Rendement : 65 %

- F = 124-125°                      Litt. F = 122-123°                      (137)

- ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>16°</sup> = -61,8° (c = 1, méthanol)                      Litt. ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>21°</sup> = -61,2°                      (137)

## B) Couplage en présence de triéthylamine

25 g (67,5 mM) d'ester actif et 5,6 g (75 mM) de glyocolle ont été traités suivant la méthode C<sub>1</sub> dans 200 cm<sup>3</sup> de solvant. Le produit

extrait à l'acétate d'éthyle a été cristallisé comme précédemment. Mêmes caractéristiques.

- Poids = 13,70 g                      Rendement = 67 % par rapport à l'ester actif

Prolyl. glycine : H-Pro-Gly-OH                      (II)

A) 2 g du dipeptide protégé (I) (non cristallisé, obtenu en A<sub>1</sub>) hydrogénés 2 heures dans 40 cm<sup>3</sup> du mélange méthanol-eau-acide acétique (25/5/1) ont donné le dipeptide, cristallisé dans l'alcool éthylique 95°.

Dissous dans l'eau, il a été précipité par l'alcool absolu, filtré et lavé plusieurs fois à l'alcool absolu jusqu'à obtention d'un produit blanc.

- Poids = 0,38 g                      Rendement = 33 %

-  $(\alpha)_D^{18} = -20^\circ$  (c = 3,1 ; H<sub>2</sub>O) Litt.  $(\alpha)_D^{17} = -19,8^\circ$  (137)

- Homogène à la chromatographie sur papier, révélé par l'iode, la ninhydrine, l'isatine : R<sub>f</sub> = 0,15

B) 7,5 g (24,5 mM) de dipetide N-protégé cristallisé (obtenu en B) nous ont donné, suivant la même méthode, 3,57 g de dipeptide.

- Rendement = 84 %

N-carbobenzoxyl. prolyl. proline : Z-Pro-Pro-OH                      (III)

44,4 g (120 mM) de Z-Pro-ONP et 13,8 g (120 mM) de proline, traités suivant la méthode C<sub>2</sub>, dans 180 cm<sup>3</sup> de pyridine, ont donné un produit filtré après acidification de la solution, lavé à l'eau et recristallisé dans le méthanol sous forme d'aiguilles blanches.

- Poids = 36g                      Rendement = 87 %

- F<sub>m</sub> 190° Litt. F<sub>m</sub> 187-190° (138)

-  $(\alpha)_D^{20} = -81,2^\circ$  (c = 2; DMF) ; Litt.  $(\alpha)_D^{22} = -80,4^\circ$  (138)

Après décarboboxylation par HBr dans l'acide acétique, la chromatographie sur papier donne une tache unique de  $Rf_6 = 0,38$ .

Après hydrogénéolyse pendant 3 heures dans méthanol-eau(1/1) on obtient un mélange du dipeptide et de la dicétopipérazine correspondante (139) révélés en chromatographie par la ninhydrine, l'isatine et l'iode pour le peptide, par l'iode seulement pour la dicétopipérazine.

- Dipeptide:  $Rf_9 = 0,10$  ;  $Rf_7 = 0,10$  (sur gel de silice)  
 $Rf_5 = 0,95$  ;  $Rf_6 = 0,38$  (sur papier Whatman n°1)
- Dicétopipérazine :  
 $Rf_9 = 0,63$  ;  $Rf_7 = 0,41$  (sur gel de silice)

Par chauffage d'1 heure, à ébullition, dans le solvant d'hydrogénéolyse, la tache due à H-Pro-Pro-OH disparaît en chromatographie, il ne subsiste que celle due à la dicétopipérazine.

N-carbobenzoxy, prolyl, prolyl, glycine: Z-Pro-Pro-Gly-OH (IV)

#### A) Méthode des esters paranitrophényles :

Par action de l'ester Z-Pro-ONP sur H-Pro-Gly-OH, suivant les différentes méthodes générales, on a obtenu, après extraction par l'acétate d'éthyle, séchage sur  $Na_2SO_4$ , évaporation du solvant et malaxage dans l'éther anhydre, le produit désiré qui a été recristallisé dans acétate d'éthyle-éther de pétrole (8/1)

- Fusion pâteuse :  $90-100^\circ$
- $(\alpha)_D^{17} = -124^\circ$  ( $c = 1$  ; MeOH) ; Litt.  $(\alpha)_D^{23} = -120,9^\circ$  (110)
- $Rf_4 = 0,15$  (sur gel de silice, révélation au chlore)

Les rendements ont été les suivants: méthode  $B_1$  : 20 % ;  $B_2$  : 5 %  
 $B_3$  : 5 % ;  $C_1$  : 31 % ;  $C_2$  : 30 %.

B) Méthode du dicyclohexylcarbodiimide :

Le couplage de Z-Pro-Pro-H et de H-Gly-OEt par le DCCI, suivi de saponification de l'ester tripeptidique, suivant la méthode utilisée par GUTTMANN et coll. (110), nous a donné 26,5 g de Z-Pro-Pro-Gly-OH (Rendement: 65 % par rapport à Z-Pro-Pro-OH et H-Gly-OEt), ayant les mêmes caractéristiques que précédemment.

Prolyl. prolyl. glycine : H-Pro-Pro-Gly-OH (V)

A) L'hydrogénéolyse de 1 g de N-carbobenzoxy. prolyl. prolyl. glycine (2,5 mM) dans 50 cm<sup>3</sup> de méthanol-eau (3/2) suivant la méthode 1, a donné, après recristallisation dans éthanol 95 %-éther (1/1), 0,600 g d'un produit qui s'est révélé hétérogène en chromatographie sur papier dans n. butanol-acide acétique-eau (7/1/2)

$Rf_6 = 0,13$  mauve à la ninhydrine: tache due au glyocolle

$Rf_6 = 0,26$  jaune à la ninhydrine, bleu à l'isatine

Par dissolution dans éthanol-éther (1/1) à chaud, on sépare du glyocolle insoluble de  $Rf_6 = 0,13$

La solution refroidie laisse déposer le tripeptide de  $Rf_6 = 0,26$ , toujours mélangé au glyocolle révélé en chromatographie.

Enfin, par évaporation à sec du filtrat, on obtient un composé qui n'est révélé en chromatographie ni par la ninhydrine, ni par l'isatine, mais par l'iode en chromatographie sur couche mince, et de même  $Rf$  que la dicétopipérazine de la proline:  $Rf_7 = 0,41$  ;  $Rf_9 = 0,63$ .

Ce dernier produit, chromatographié sur papier après hydrolyse d'1 heure, à ébullition, dans HCl 6N, révèle le dipeptide et la proline à la ninhydrine et à l'isatine (solvant : phénol-eau 75/25)

Pro :  $Rf_5 = 0,84$  ; Pro-Pro :  $Rf_5 = 0,95$

B) 25 g de tripeptide N protégé (IV) hydrogénés, suivant la méthode 2, dans 100 cm<sup>3</sup> d'acide acétique, pendant 4 h. 30, ont donné 20,6 g de tripeptide

- Rendement quantitatif en acétate
- Produit très hygroscopique;  $F = 154^\circ$
- Homogène à la chromatographie sur papier, révélé par la ninhydrine et par l'isatine :  $Rf_6 = 0,26$  ;  $Rf_8 = 0,16$  ;  $Rf_9 = 0,25$
- Homogène à la chromatographie sur couche mince révélé par la ninhydrine, l'isatine et le chore.  $Rf_9 = 0,43$  ;  $Rf_4 = 0$

C) Un échantillon de tripeptide N-protégé (IV), décarboxylé par HBr dans CH<sub>3</sub>COOH, s'est révélé homogène en chromatographie sur papier et sur couche mince, identique au produit précédent.

N<sub>α</sub>.N<sub>ε</sub>-dicarbobenzoxyl. lysyl. prolyl. prolyl. glycine:



17 g (52 mM) de H-Pro-Pro-Gly-OH sous forme d'acétate et 27,8 g d'ester Z-Lys(Z)-ONP ont été traités suivant la méthode C<sub>1</sub>, dans 200 cm<sup>3</sup> de solvant.

Après extraction à l'acétate d'éthyle, lavage à l'eau et à NaCl saturé, séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, l'évaporation à sec donne une huile malaxée deux fois dans 100 cm<sup>3</sup> d'éther anhydre, et séchée sous vide; on obtient ainsi un produit pulvérulent hygroscopique, contenant encore des traces de p. nitro-phénol et de N<sub>α</sub>.N<sub>ε</sub>-dicarbobenzoxyl lysine visibles en chromatographie sur couche mince révélée par le chlore (solvant benzène-dioxanne-acide acétique (90/25/4)).

- Poids : 23,5 g                      Rendement = 72 %
- $(\alpha)_D^{16^\circ} = -78^\circ 5$  (c = 1; méthanol) Litt.  $(\alpha)_D^{20^\circ} = -102^\circ 8$  (104)
- $(\alpha)_D^{23^\circ} = -89^\circ 7$  (103)

Un échantillon a été purifié par malaxages répétés dans l'éther anhydre.

- analyse :  $C_{34}H_{43}O_9N_5, H_2O$

Calc. % : C = 59,72      H = 6,63      N = 10,24

Tr. : 59,88      6,70      10,22

Purification sur colonne de silice:

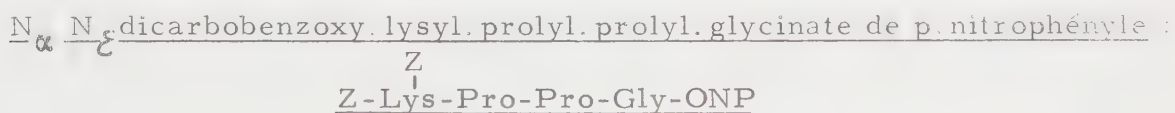
5g de produit brut dissous dans l'acétate d'éthyle sont passés sur une colonne de diamètre 3 cm remplie de 60 g d'acide silicique Mallinckrodt et 20 g de célite 245. Les impuretés sont éluées par 200 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, le tétrapeptide N-protégé par 200 cm<sup>3</sup> de méthanol.

Les fractions recueillies sont contrôlées par chromatographie sur couche mince.

Rendement : 80 % par rapport au produit brut.

- un échantillon (50 mg) traité par le sodium dans l'ammoniac liquide n'a révélé qu'une seule tache par électrophorèse à pH 1,9 et 5,6 (révélation à la ninhydrine), ayant même migration qu'un échantillon traité par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique.

- l'hydrolyse d'un échantillon (33 mg) dans 3 cm<sup>3</sup> HCl 6N à 105° pendant 24 heures, suivie d'une électrophorèse semi quantitative a donné les proportions suivantes : Lysine: 1 ; Glycocolle : 1,2 ; Proline : 2,3



Préparé par action de dicyclohexylcarbodiimide sur l'acide tétrapeptidique et le p. nitrophénol en excès de 20 % dans le DMF ; la dicyclohexylurée filtrée, le produit est précipité par dilution à l'eau, extrait par l'acétate d'éthyle. La solution organique est lavée par NaHCO<sub>3</sub> à froid, séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, évaporée à sec et le résidu malaxé plusieurs fois dans l'éther

anhydre jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. N'a pu être obtenu exempt de p. nitrophénol et de l'acide libre, visibles en chromatographie sur couche mince.

L'essai portant sur 540 mg d'acide tétrapeptidique donne 190 mg d'ester.

Rendement : 35 % .

$Rf_4 = 0,42$  sur couche mince, tache jaune, révélée également au chlore.



A) Par ester p. nitrophénylique en milieu sodique.

0,83 g (2,78 mM) de  $\text{N}_{\epsilon}$ .tosyl.lysine et 1 g (2,32 mM) de Z-Phe-ONP sont traités suivant la méthode  $B_2$  pendant 24 heures. Le produit huileux obtenu est extrait par l'acétate d'éthyle, séché sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , la solution est évaporée et le résidu, malaxé dans l'éther anhydre, donne 0,75 g de produit pulvérulent (Rendement: 42 %)

-  $F = 90-92^\circ$  ; recristallisé dans acétate d'éthyle-éther de pétrole (1/1):  $F = 92-93^\circ$

-  $(\alpha)_D^{18} = -4,2^\circ$  (  $c = 4$  ; DMF)

- sur couche mince :  $Rf_4 = 0,45$  ;  $Rf_1 = 0,12$  ;  $Rf_6 = 0,83$

- Analyse :  $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

Calc. % : C = 62,00      H = 6,02      N = 7,23

Tr. :      61,97      6,09      7,19

Par la méthode  $B_1$ , on obtient en 6 heures de réaction, le même produit avec un rendement de 62 %.

B) Par ester p. nitrophénylique en présence de triéthylamine

4,2 g (10 mM) d'ester actif et 3 g de  $\text{N}_{\epsilon}$ -tosyl.lysine traités

suivant la méthode C<sub>3</sub> dans 60 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide pendant 24 heures (dissolution totale de l'acide aminé en 2 heures), ont donné le même produit que précédemment.

Poids obtenu : 4,7 g      Rendement : 83 %



4 g (6,9 mM) de dipeptide N-protégé (VII) sont hydrogénés pendant 2 heures dans 200 cm<sup>3</sup> de mélange eau-méthanol-acide acétique (8/5/1) (dissolution totale en 30 minutes). Le produit cristallise dans méthanol-éther (1/1) et est lavé par le même solvant jusqu'à obtention d'un produit blanc :

- Poids : 2,68 g      Rendement : 87 %
- F : 190°
- sur papier: Rf<sub>7</sub> = 0,58 ; Rf<sub>10</sub> = 0,85 ; Rf<sub>8</sub> = 0,70 (révélation par ninhydrine)
- sur couche mince: Rf<sub>7</sub> = 0,72 (révélation par ninhydrine et chlore)
- Analyse : C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

|           |           |          |          |
|-----------|-----------|----------|----------|
| Calc. % : | C = 59,05 | H = 6,53 | N = 9,39 |
| Tr. :     | 59,10     | 6,69     | 9,45     |

N. carbobenzoxy. prolyl. phénylalanyl. N<sub>ε</sub> tosyl lysine :



1,85 g (5 mM) de Z-Pro-ONP et 2 g (5 mM) de dipeptide VIII sont traités suivant la méthode C<sub>3</sub> pendant 24 heures dans 30 cm<sup>3</sup> de solvant.

Après extraction par l'acétate d'éthyle, séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation à sec, le résidu est repris dans le minimum d'acétate d'éthyle et cristallisé par addition lente d'éther. Recristallisation dans éthanol-eau (2/1)

- Poids : 2,61 g      Rendement : 86 %
- F : 146-147°

- sur couche mince :  $Rf_3 = 0,85$  ;  $Rf_4 = 0,37$  ;  $Rf_2 = 0,12$  ;  $Rf_6 = 0,80$   
(révélation par le chlore)

- Analyse :  $C_{35}H_{42}N_4O_8S$

Calc. % : C = 61,95      H = 6,19      N = 8,25

Tr. : 61,45      6,40      8,23

Protyl. phénylalanyl. N $\epsilon$ -tosyl. lysine : H-Pro-Phe-Lys-OH (X)

1,57 g de tripeptide N-protégé (IX) sont hydrogénés 1h30 dans 40 cm<sup>3</sup> du mélange méthanol-eau-acide acétique (7/4/3).

Cristallisation dans éthanol-éther (1/2) et lavage à l'éthanol tiède

- Poids obtenu : 1,54 g      Rendement : 96 %

- F (déc) : 235°

-  $(\alpha)_D^{17} = -10,2^\circ$  (c = 2 ; méthanol)

- sur papier  $Rf_{10} = 0,90$  ;  $Rf_6 = 0,81$

- sur couche mince  $Rf_7 = 0,55$

- Analyse :  $C_{27}H_{36}N_4O_6S, H_2O$

Calc. % : C = 57,63      H = 6,80      N = 9,95

Tr. : 57,63      6,86      9,84

N carbobenzoxy phénylalanyl. N $\epsilon$ -tosyl lysinate de méthyle :

Z-Phe-Lys-OMe (XI)

15 g (42,6 mM) de chlorhydrate de N $\epsilon$ -tosyl lysinate de méthyle sont traités par 18 g (42,6 mM) d'ester Z-Phe-ONP suivant la méthode A<sub>1</sub> dans 300 cm<sup>3</sup> de chloroforme pendant 48 heures à 30°. Recristallisation dans l'éthanol.

- Poids obtenu : 17,1 g      Rendement: 70 %

- F : 152-153°

-  $(\alpha)_D^{18} = -10,1^\circ$  (c = 1 ; DMF)

- Sur couche mince (révélation au chlore) :  $Rf_4 = 0,77$

- Analyse :  $C_{31}H_{37}N_3O_7S$

Calc. % : C = 62,51      H = 6,26      N = 7,06

Tr. : 62,09      6,13      7,33

N. carbobenzoxyl prolyl. phénylalaninyl. N $\epsilon$ .tosyl lysinate de méthyle.

Tos

Z-Pro-Phe-Lys-OMe (XII)

13 g (21,8 mM) de Z-Phe-Lys(Tos)OMe(XI) hydrogénés 2 heures dans 300 cm<sup>3</sup> de méthanol sont traités par 8,07 g (21,8 mM) de Z-Pro-ONP suivant la méthode A<sub>2</sub> dans 90 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle pendant 24 heures à 35°.

Le produit est ensuite dissous dans l'acétate d'éthyle, un insoluble filtré à chaud, le produit cristallise par refroidissement; recristallisation dans le méthanol :

- Poids obtenu : 11,80 g      Rendement: 78 %

- F = 172°

-  $(\alpha)_D^{15} = -37^\circ$  (c = 1 ; DMF)

- par chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore):

$Rf_4 = 0,56$  ;  $Rf_7 = 0,69$  ;  $Rf_3 = 0,89$  ;  $Rf_1 = 0,12$

- Analyse :  $C_{36}H_{44}N_4O_8S$

Calc. % : C = 62,41      H = 6,40      N = 8,09

Tr. : 62,03      6,31      7,91

Le produit insoluble dans l'acétate d'éthyle à chaud, a été trouvé identique par chromatographie sur couche mince à la dicétopipérazine obtenue par chauffage, dans le solvant d'hydrogénolyse, du H-Phe-Lys(Tos)-OMe.

L'hydrolyse par HCl 6 N, 24 heures à 110°, donne, en électrophorèse à pH 1,8, la phénylalanine, la lysine et la lysine N $\epsilon$  tosylée (révélation par la ninhydrine et l'isatine).

N. carbobenzoxy, phénylalananyl, sérinate de méthyle : Z-Phe-Ser-OMe (XIII)

A) Par l'ester p. nitrophénylique.

1,85 g (12 mM) de H.Ser-OMe, HCl et 5 g (12 mM) de Z-Phe-ONP sont traités suivant la méthode A<sub>1</sub> dans 35 cm<sup>3</sup> de chloroforme.

Le produit est ensuite dissous à chaud dans l'acétate d'éthyle, et précipité à chaud par l'hexane.

- Poids : 2,5 g                      Rendement : 52 %
- F : 124°              Litt. F : 125° (140)
- Sur couche mince (révélation au chlore): Rf<sub>4</sub> = 0,53 ; Rf<sub>3</sub> = 0,85

B) Par le dicyclohexylcarbodiimide

9,5 g du même produit ont été obtenus par la méthode de BOISSONNAS (140) avec un rendement de 80 %

N. carbobenzoxy, phénylalananyl, séril hydrazide : Z-Phe-Ser-NH-NH<sub>2</sub> (XIV)

8 g d'ester méthylique (XIII) sont traités par 2,5 cm<sup>3</sup> d'hydrate d'hydrazine pendant une nuit dans 60 cm<sup>3</sup> de méthanol à température ordinaire, selon BOISSONNAS (140).

Le précipité formé est lavé au méthanol et à l'éther.

- Poids obtenu : 7,4 g                      Rendement: 93 %
- F = 189-190°      Litt. F = 193° (140) et F = 182° (141)

N. carbobenzoxy, phénylalananyl, séril, prolyl, phénylalananyl, N<sup>Tos</sup>-tosyl lysinate de méthyle : Z-Phe-Ser-Pro-Phe-Lys-OMe (XV)

L'azide Z-Phe-Ser-N<sub>3</sub>, préparé à partir de 2,4 g (6 mM) de l'hydrazide a été couplé avec l'ester tripeptidique obtenu par hydrogénolyse,

pendant 2 h 30, dans 120 cm<sup>3</sup> de méthanol, de 4 g (5,8 mM) de Z-Pro-Phe-Lys (Tos)-OMe, suivant la méthode générale, dans 20 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide.

Après évaporation à sec, le résidu est malaxé dans l'éther anhydre jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent filtré et recristallisé dans méthanol-acétone (1/1)

- Poids obtenu : 3,82 g                      Rendement : 71 %
- F = 199-200°
- $(\alpha)_D^{18} = -35^\circ$  (c = 1,1; DMF)
- en chromatographie sur couche mince (révélation au chlore)

Rf<sub>4</sub> = 0,35 ; Rf<sub>6</sub> = 0,79

- Analyse : C<sub>48</sub>H<sub>58</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S
- Calc. % : C = 62,18                      H = 6,30                      N = 9,13
- Tr. : 61,91                                  6,44                                  8,91

Dans un essai préliminaire, l'hydrogénolyse du dérivé tripeptidique a été réalisée dans méthanol-acide acétique (4/1), et le couplage dans la solution non débarrassée de l'acétate d'éthyle, en présence d'une quantité équivalente de triéthylamine, le rendement en pentapeptide protégé n'a été que de 35 %.

N<sub>ε</sub> dicarbobenzoxyl lysyl, prolyl, prolyl, glycyl, phénylalananyl, séryl, prolyl, phénylalananyl, N<sub>ε</sub> tosyl lysinate de méthyle :



L'ester pentapeptidique obtenu par hydrogénolyse de 2,70 g (2,92 mM) de (XV), pendant 10 heures dans 240 cm<sup>3</sup> de méthanol, est traité avec 1,95 g (2,92 mM) de Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-OH, par 0,604 g de DCCI suivant la méthode générale B<sub>2</sub>, dans 60 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile-diméthylformamide (5/1).

Par malaxage dans l'éther anhydre, on obtient 4,103 g d'un produit pulvérulent, purifié par précipitation de la solution méthanolique par l'éther anhydre.

- Poids obtenu : 3,10 g      Rendement : 73 %
- $(\alpha)_D^{20} = -78,6^\circ$  (c = 1 ; méthanol)
- Par chromatographie sur couche mince (révélation au chlore):

$Rf_1 = 0,46$  ;  $Rf_6 = 0,76$

- Analyse :  $C_{74}H_{93}N_{11}O_{17}S, H_2O$

Calc. % :    C = 59,55      H = 6,56      N = 10,57

Tr.        :        61,08            6,64            10,32

N N<sub>ε</sub> dicarbobenzoxy lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalanyl. séryl. prolyl. phénylalanyl. N<sub>ε</sub> tosyl lysine :



La saponification de 2,41 g (1,69 mM) d'ester méthylique (XXIX) suivant la méthode générale a donné un précipité filtré, lavé à froid à l'eau et séché sur  $\text{CaCl}_2$

- Poids obtenu : 2,12 g      Rendement : 91 %
- $(\alpha)_D^{28} = -65,5^\circ$  (C = 1 ; méthanol)
- Par chromatographie sur couche mince (révélation au chlore)

$Rf_2 = 0,12$  ;  $Rf_6 = 0,75$  ;  $Rf_1 = 0$  ;  $Rf_4 = 0$

- Analyse :  $C_{73}H_{91}N_{11}O_{17}S, 2 H_2O$

Calc. % :    C = 59,92      H = 6,54      N = 10,53

Tr.        :        59,92            6,59            10,53

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalanyl. séryl. prolyl. phénylalanyl. lysine :  
Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Lys (Peptide A)

941 mg (0,66 mM) d'acide nonapeptidique (XVII) traités par Na dans  $\text{NH}_3$  liquide (méthode 2) ont donné, après dessalification, 655 mg de produit brut et, après purification sur Sephadex, 207 mg de produit homogène. Rendement 25 %.

$$- (\alpha)_D^{20} = -82,4^\circ \quad (c = 0,5, \text{H}_2\text{O}) \quad \text{Litt. } (\alpha)_D^{22} = -95,2^\circ \quad (103)$$

- Chromatographie sur couche mince (révélation par la ninhydrine):  $\text{Rf}_{11} = 0,40$  ;  $\text{Rf}_{12} = 0,24$  ;  $\text{Rf}_{13} = 0,50$

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine: 0,63 (pH 1,9) ; 0,72 (pH 2,3) ; 0,70 (pH 5,8) ; 0,39 (pH 8,6)

- Analyse :  $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{O}_{11}\text{N}_{11}$ , 2  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 4  $\text{H}_2\text{O}$

Calc. % : C = 54,22 H = 7,50 N = 12,88

Tr. : 53,98 7,58 12,88

- Proportions relatives d'acides aminés.

|         | Lys  | Pro  | Gly  | Phe  | Ser  |
|---------|------|------|------|------|------|
| Calc. : | 2    | 3    | 1    | 2    | 1    |
| Tr. :   | 2,00 | 2,68 | 1,03 | 1,78 | 0,71 |

- Le comportement en chromatographie sur couche mince et en électrophorèse est identique à celui d'échantillons de 1,9-lysine-bradykinine fournis par le Dr. SCHRÖDER et le Prof. GRASSMANN.

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyL. phénylalanyl. séryl. prolyl. phénylalanyl N-tosyl.

lysine :



100 mg (0,14 mM) d'acide peptidique (XVII), hydrogénés 6 heures dans 20  $\text{cm}^3$  de méthanol-eau (1/1), ont donné, après évaporation du solvant, 142 mg (85 %) de produit pulvérulent qui n'a pas subi de purification.

- Chromatographie sur couche mince : 1 tache principale de  $\text{Rf}_{11} = 0,6$  ;  $\text{Rf}_{12} = 0,32$  ;  $\text{Rf}_{13} = 0,59$  et 1 tache faible de  $\text{Rf}$  légèrement

supérieur .

- Migration électrophorétique , par rapport à la lysine : 0,43 (pH 1,9) ; 0,63 (pH 2,3) ; 0,44 (pH 5,8) .

#### IV - PEPTIDE B

N. carbobenzoxy. glycyL. N<sub>ε</sub>-tosyl. lysinate de méthyle : Z-Gly-Lys<sup>Tos</sup>-OMe (XVIII)

##### A) Par l'ester p. nitrophénylique

5 g de chlorhydrate de H-Lys(Tos)-OMe (14,2 mM) ont été traités par 4,68 g (14,2 mM) de Z-Gly-ONP suivant la méthode générale A dans 50 cm<sup>3</sup> de CHCl<sub>3</sub> et 3 cm<sup>3</sup> de triéthylamine pendant 3 jours à température ordinaire.

On obtient une huile qui durcit par séchage sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, mais n'a pu être cristallisée dans aucun solvant; hygroscopique.

- Poids obtenu : 2,5 g                      Rendement : 35 %
- Chromatographie sur couche mince (révélation au chlore) :

Rf<sub>4</sub> = 0,47

##### B) Par le dicyclohexyl carbodiimide

3,5 g de H-Lys(Tos)-OMe, HCl (10 mM) et 2,37 g (10 mM) de Z-Gly-OH traités par 2,06 g de DCCI suivant la méthode A pendant 2 heures à 0°, et 4 heures à température ordinaire, donnent 3,9 g d'un produit identique au précédent (Rendement = 75 % )

N. carbobenzoxy. prolyl. glycyL. N<sub>ε</sub>-tosyl. lysinate de méthyle:  

$$\text{Z-Pro-Gly-Lys}^{\text{Tos}}\text{-OMe} \quad (\text{XIX})$$

##### A) Par l'ester p. nitrophénylique.

2,4 g du dérivé dipeptidique (XVIII) (4,75 mM) sont hydrogénés

1h30 dans 25 cm<sup>3</sup> de méthanol, puis traités par 1,76 g (4,75 mM) de Z-Pro-ONP, suivant la méthode A<sub>3</sub> dans 20 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, pendant 26 heures à 35°.

On obtient une gomme jaune qui n'a pu être cristallisée dans aucun solvant.

- Poids obtenu : 1,8 g                      Rendement : 63 %
- N'a pu être obtenu homogène en chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore):  $Rf_4 = 0,24$  ;  $Rf_7 = 0,70$  ;  $Rf_1 = 0,50$ .

Comme impuretés: une tache jaune ( $Rf_4 = 0,73$ ) due à un produit p.nitrophénylique et une tache révélée au chlore et non à la ninhydrine ( $Rf_4 = 0,07$ ) identique à celle donnée par Z-Gly-Lys(Tos)-OMe hydrogéné et abandonné 24 heures à  $35^\circ$ , et que nous supposons être due à la dicétopipérazine correspondante.

B) Par le dicyclohexylcarbodiimide.

8,1 g de chlorhydrate de N $\epsilon$ -tosyl lysinate de méthyle (23 mM) et 7,06 g (23 mM) de Z-Pro-Gly-OH traités par 4,76 g de DCCl, suivant la méthode générale A, pendant 14 heures à 0°, et 8 heures à température ordinaire, donnent 12 g d'un produit pulvérulent, qui n'a pu être cristallisé; homogène en chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore) avec les mêmes Rf que précédemment.

- Rendement : 90 %
- $(\alpha)_D^{15} = -29.8$  (c = 1 ; méthanol)

N. carbobenzoxy. phénylalanyl. séryl. proyl. glycyL. N $\epsilon$  tosyl lysinate de méthyle:  

$$\text{Z-Phe-Ser-Pro-Gly-Lys(OMe)-O-Tos} \quad (\text{XX})$$

Préparé, suivant la méthode générale, par action de l'azide  
Z-Phe-Ser-N<sub>3</sub>, obtenu à partir de 4,2 g (10,5 mM) de l'hydrazide (XIV), sur

l'ester tripeptidique obtenu par hydrogénolyse pendant 2 h 30 dans 100 cm<sup>3</sup> de méthanol, de 6,02 g (10 mM) de Z-Pro-Gly-Lys(Tos)-OMe.

Le résidu obtenu par évaporation du diméthylformamide est repris dans 130 cm<sup>3</sup> d'acétate d'éthyle, lavé par NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, HCl 0,5 N, NaCl saturé, puis séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation à sec, le résidu est repris 2 fois dans 25 cm<sup>3</sup> de méthanol et précipité à chaque fois par addition d'éther anhydre.

- Poids obtenu : 5,0 g                      Rendement : 60 %

- F : 96-98° (fusion pâteuse)

- ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>17°</sup> = -28° (c = 1 ; méthanol)

- Chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore) :

Rf<sub>1</sub> = 0,30 ; Rf<sub>4</sub> = 0,10 ; Rf<sub>7</sub> = 0,85

- Analyse : C<sub>41</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S ; 1/3 H<sub>2</sub>O

Calc. % : C = 58,42                      H = 6,33                      N = 9,97

Tr. :                      58,43                      6,37                      9,97

N<sub>α</sub>-N<sub>ε</sub>-dicarbobenzoxyl-lysyl-prolyl-prolyl-glycyl-phénylalaninyl-séryl-prolyl-glycyl-N<sub>ε</sub>-tosyl-lysinate de méthyle:



3,97 g (4,75 mM) du composé (XIX) hydrogénés pendant 4 heures, dans 80 cm<sup>3</sup> de méthanol, sont ensuite couplés avec 3,16 g (4,75 mM) de Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-OH, par 0,977 g de DCCI dans 60 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile-diméthylformamide (5/1) suivant la méthode générale B<sub>2</sub>.

Par malaxage dans l'éther anhydre, on obtient 5,35 g d'un produit blanc pulvérulent (Rendement 83 %), qui est purifié par précipitation de la solution méthanolique par l'éther.

- Poids = 4,52 g ;                      Rendement = 70 %

-  $(\alpha)_D^{28} = -64^{\circ}2$  ( $c = 1,2$  ; méthanol)

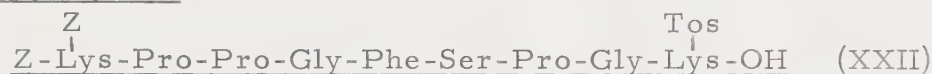
- En chromatographie sur couche mince (révélé au chlore, visible en lumière U.V. sur gel GF<sub>254</sub>) :  $Rf_1 = 0,10$  ;  $Rf_2 = 0,23$  ;  $Rf_6 = 0,60$

- Analyse :  $C_{67}H_{87}N_{11}O_{17}S$  ,  $H_2O$

Calc. % : C = 58,82      H = 6,55      N = 11,27

Tr. :      58,65      6,56      11,04

N<sub>α</sub>, N<sub>ε</sub> dicarbobenzoxy. lysyl. prolyl. prolyl. glycyL. phénylalanyl. séryl. prolyl. glycyL. N<sub>ε</sub> tosyl. lysine :



La saponification de 3,43 g (2,52 mM) de l'ester (XXI), suivant la méthode générale, donne un produit en suspension qui est centrifugé et lavé deux fois à l'eau par mise en suspension et centrifugation. On sèche ensuite sur  $CaCl_2$  et, par malaxage dans l'éther anhydre, on obtient un produit pulvérulent qui est filtré et séché sous vide.

- Poids : 2,79 g      Rendement = 82 %

-  $(\alpha)_D^{20} = -62^{\circ}3$  ( $c = 1$  ; méthanol)

- En chromatographie sur couche mince sur gel GF<sub>254</sub> (révélation en lumière U.V. et au chlore) :  $Rf_6 = 0,45$  ;  $Rf_1 = 0$  ;  $Rf_4 = 0$

- Analyse :  $C_{66}H_{85}N_{11}O_{17}S$  ,  $2 H_2O$

Calc. % : C 57,75      H = 6,68      N = 11,23

Tr. :      57,87      6,62      11,05

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyL. phénylalanyl. séryl. prolyl. glycyL. lysine :

Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Gly-Lys (peptide B)

500 mg (0,36 mM) d'acide nonapeptidique (XXII) traités par Na dans  $NH_3$  liquide suivant la méthode 1 ont donné 412 mg de produit dessalifié.

Un essai de purification (contrôlé par électrophorèse) en précipitant la solution méthanolique par l'éther, n'a donné aucun résultat.

Deux nouvelles purifications sur colonne de Sephadex nous ont permis d'isoler 65 mg de produit homogène (Rendement 17 %)

$$- (\alpha)_D^{20} = -77^{\circ}0 \quad (c = 1,2, H_2O)$$

- Chromatographie sur couche mince:  $Rf_{11} = 0,14$ ;  $Rf_{12} = 0,10$  ;

$$Rf_{13} = 0,31$$

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine: 0,63 (pH 1,9) ; 0,76 (pH 2,3) ; 0,44 (pH 8,6)

- Analyse :  $C_{43}H_{67}N_{11}O_{11}$ , 2  $CH_3COOH$ , 4  $H_2O$

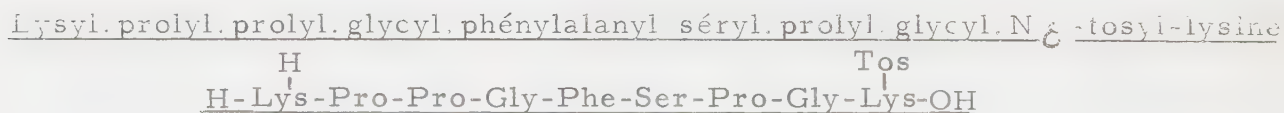
Calc. % : C = 50,79      H = 7,98      N = 13,86

Tr. :      50,83      7,82      14,11

- Proportions relatives d'acides aminés :

|        | Lys | Pro  | Gly  | Phe  | Ser  |
|--------|-----|------|------|------|------|
| Cal. : | 2   | 3    | 2    | 1    | 1    |
| Tr. :  | 2   | 2,70 | 2,00 | 1,04 | 0,70 |

Une seconde opération, suivant la méthode 2, portant sur 1,22 g (0,916 mM) du dérivé (XXII), a donné 306 mg du même produit (rendement = 31 %)



200 mg (0,15 mM) d'acide (XXII), hydrogénés dans 20 cm<sup>3</sup> de méthanol-eau-acide acétique (10/9/1) pendant 5 h 30, ont donné, après évaporation du solvant, reprise dans H<sub>2</sub>O et lyophilisation, 185 mg de produit qui n'a pas subi de purification ultérieure (Rendement quantitatif)

- Chromatographie sur couche mince; une tache principale :

$Rf_{11} = 0,57$  ;  $Rf_{12} = 0,32$  ;  $Rf_{13} = 0,56$  et une tache faible de Rf légèrement supérieur.

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine: 0,60 (pH 2,3) ; 0,35 (pH 5,8).

## V - PEPTIDE C

### Dicéto-2,5 pipérazine

#### A) Suivant la méthode de Fischer (142)

10 g de chlorhydrate de glycinate d'éthyle, en suspension dans 6 cm<sup>3</sup> d'eau, agités à -10°, sont neutralisés par la soude concentrée ; après dissolution, le mélange est laissé 24 heures à température ordinaire. Le produit précipité est filtré, lavé à l'eau et recristallisée dans l'eau.

- Poids obtenu : 2 g                      Rendement : 25 %

#### B) Méthode de Sannié (123)

60 g de glycolle, en suspension dans 300 cm<sup>3</sup> d'éthylène glycol, sont chauffés 5 heures à reflux. Le solvant distillé sous vide, le résidu est repris à chaud dans l'eau, décoloré par du noir végétal à ébullition, cristallisé par addition d'éthanol et recristallisé dans l'eau.

- Poids obtenu : 23 g                      Rendement : 50 %

### Essais d'ouverture de la dicéto-2,5 pipérazine

#### A) Par action de HCl concentré (47)

5 g de dicéto-2,5 pipérazine en solution dans HCl concentré, portés rapidement à ébullition, sont refroidis immédiatement dans la glace; le précipité obtenu (2,58 g) est lavé à l'alcool.

Ce produit n'a pu être débarrassé du glycolle qui s'y trouvait en très forte proportion (  $Rf_5 = 0,40$  par chromatographie sur papier).

B) Par action de HCl gazeux dans l'éthanol (142)

5 g de dicétopipérazine en suspension dans 100 cm<sup>3</sup> d'éthanol sont traités à ébullition, par HCl gazeux.

Ici encore c'est le chlorhydrate de glycinate d'éthyle ( $F = 144^\circ$ ) que nous avons isolé par recristallisations successives dans l'éthanol, et non le chlorhydrate de glycyglycinate d'éthyle attendu.

N. carbobenzoxy glycyglycinate d'éthyle : Z-Gly-Gly-OEt (XXIII)

Préparé par le dérivé "phosphorazo" selon GOLDSCHMIDT (101): 12,9 g (93 mM) de H-Gly-OEt, HCl, dans 120 cm<sup>3</sup> de pyridine, sont traités par PCl<sub>3</sub>, pendant 30 minutes, à température ordinaire; le mélange est additionné de 19,5 g (93 mM) de Z-Gly-OH et chauffé au bain-marie pendant 3 heures en évitant toute trace d'humidité.

Après évaporation du solvant, le résidu est repris par une solution de NaHCO<sub>3</sub> 10 % et extrait à l'acétate d'éthyle; la solution organique est lavée par NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, HCl N, H<sub>2</sub>O et séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; le produit est précipité par addition d'éther de pétrole. Recristallisation dans acétate d'éthyle-éther de pétrole (1/1)

- Poids obtenu : 19 g      Rendement : 70 %

-  $F = 82^\circ$     Litt.  $F = 82^\circ$     (101)

N. carbobenzoxy glycyglycine : Z-Gly-Gly-OH (XXIV)

16,2 g ( 55 mM) de l'ester (XXIII), saponifiés dans le méthanol par NaOH, suivant la méthode générale, ont donné 11 g d'acide dipeptidique N-protégé (Rendement = 75 %)

-  $F = 177-179^\circ$       Litt.  $F = 178^\circ$       (101)

N. carbobenzoxy glycyglycinate de paranitrophényle : Z-Gly-Gly-ONp

La méthode utilisée par BODANSZKY(39) (action de DCCI sur

le mélange de l'acide peptidique et du p. nitrophénol dans le diméthylformamide, et précipitation du produit en diluant par l'eau) nous a donné 1,9 g de l'ester p. nitro phénylique. Rendement = 50 %.

-  $F = 164^{\circ}5$                       Litt.  $F = 164^{\circ}5$  (39)

- Par chromatographie sur couche mince: tache jaune, révélée par le chlore.  $Rf_4 = 0,58$

#### Glycyl. Glycine: H-Gly-Gly-OH

4,75 g (18 mM) de Z-Gly-Gly-OH, hydrogénés dans 200 cm<sup>3</sup> de méthanol-eau (1/2), ont donné 2,1 g de dipeptide, après recristallisation dans éthanol-eau (Rendement = 88 %).

- Par chromatographie sur couche mince (révélation à la ninhydrine et au chlore):  $Rf_7 = 0,09$

#### N. chloracétyl. glycyl. glycine

Préparé selon FISCHER (142) par action, à  $-5^{\circ}$ , du chlorure de l'acide chloracétique sur la dicéto-2,5 pipérazine, en milieu sodique, le produit est extrait à l'acétate d'éthyle après acidification à froid et la solution évaporée, après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Recristallisation dans l'eau, puis dans acétate d'éthyle-éthanol (1/1) :

- Poids obtenu = 4,3 g                      Rendement = 20 %

-  $F = 176^{\circ}$  (déc.)                      Litt.  $F = 178-180^{\circ}$                       (142)

#### Diglycyl. glycine : H-Gly-Gly-Gly-OH

H-Gly-Gly-Gly-OH a été préparé par amination de N. chloracétyl. glycyl. glycine.

1,5 g de N-chloracétyl glycyl. glycine en solution dans 30 cm<sup>3</sup> de NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (1/2) sont agités 10 heures à  $40^{\circ}$  ; la solution est évaporée à sec et le résidu cristallise par addition d'éthanol. Recristallisation 2 fois

par addition lente d'éthanol à la solution aqueuse.

- Poids obtenu = 0,55 g      Rendement = 40 %
- Par chromatographie sur papier  $Rf_5 = 0,51$  (révélé par la ninhydrine)

Une deuxième opération réalisée en agitant une solution identique 3 jours à température de la pièce a donné le même produit avec un rendement de 60 %.

N. carbobenzoxy. diglycyl. glycine : Z-Gly-Gly-Gly-OH

A) Par action du chloroformiate de benzyle sur la diglycyl. glycine 1,5 g de tripeptide en solution dans 8 cm<sup>3</sup> de NaOH N, sont traités, à 0°, par un excès de 20 % de chloroformiate de benzyle ajouté goutte à goutte en même temps que NaOH N.

La solution, lavée par l'acétate d'éthyle, est acidifiée à froid à pH2 par HCl 4N. Le produit cristallisé est filtré et lavé à l'eau.

- Poids obtenu = 0,720 g      Rendement = 27 %
- F = 195°      Litt. F = 195°      (143)

B) Par action de Z-Gly-ONP sur H-Gly-Gly-OH

0,250 g (1,9 mM) de H-Gly-Gly-OH sont traités, suivant la méthode 2, par 0,625 g d'ester actif dans 10 cm<sup>3</sup> de pyridine pendant 24 heures à 35°. Le précipité obtenu par acidification est filtré, lavé à l'eau et à l'éther.

- Poids obtenu = 0,315 g      Rendement = 51 %
- F = 199-200°

Le point de fusion est inchangé par recristallisation dans l'éthanol.

N. carbobenzoxy. diglycyl. glycinate de paranitrophényle: Z-Gly-Gly-Gly-ONP

Préparé comme Z. Gly-Gly-ONP : 0,7 g (2,26 mM) d'acide tripeptidique ont donné 0,340 g d'ester (Rendement = 34 %)

- F = 219°                      Litt. F = 218-220°                      (39)

N. carbobenzoxy. glycyl. glycyl. prolyl. phénylalanyl. N<sup>Tos</sup> ε tosyl. lysinate de méthyle:

$$\text{Z. Gly-Gly-Pro-Phe-Lys(OMe)} \quad (\text{XXV})$$

#### A) Couplage par l'ester paranitrophénylique.

L'ester tripeptidique obtenu par hydrogénolyse de 1 g (1,45 mM) de Z-Pro-Phe-Lys(Tos)-OMe 2 heures dans 30 cm<sup>3</sup> de méthanol (dissolution totale en 30 minutes) est traité par 0,56 (1,45 mM) de Z-Gly-Gly-ONP, dans 10 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide suivant la méthode A<sub>4</sub> ; Recristallisation deux fois dans le méthanol.

- Poids obtenu = 0,9 g                      Rendement = 78 %

- F = 121 - 122°

-  $(\alpha)_D^{15} = -34^{\circ}2$  (c = 1,3 ; DMF)

- En chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore):

Rf<sub>4</sub> = 0,12 ; Rf<sub>3</sub> = 0,85 ; Rf<sub>7</sub> = 0,80

- Analyse : C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>S, H<sub>2</sub>O

Calc. % : C = 58,24                      H = 6,35                      N = 10,19

Tr. : 58,61                      6,38                      9,88

Un échantillon a été saponifié et chromatographié sur couche mince : Rf<sub>4</sub> = 0 ; Rf<sub>7</sub> = 0,65 (révélation au chlore), puis traité ensuite par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique et trouvé homogène en électrophorèse à pH 1,9, ainsi que par chromatographie sur papier (révélation par la ninhydrine) : Rf<sub>6</sub> = 0,67.

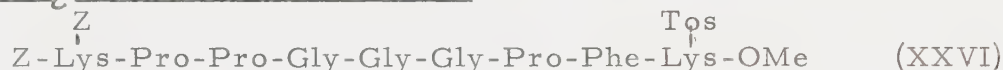
## B) Couplage par le dicyclohexyl carbodiimide :

L'ester tripeptidique obtenu par hydrogénolyse de 4,4 g (6,50 mM) de Z-Pro-Phe-Lys(Tos)-OMe est traité avec 1,72 g (6,5 mM) de Z-Gly-Gly-OH par 1,34 g de DCCI suivant la méthode B<sub>1</sub>, dans 50 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile-diméthylformamide (4/1) ; Recristallisation dans méthanol-acétone (1/1)

Poids obtenu = 5 g      Rendement = 95 %

Mêmes caractéristiques que le produit précédent.

N<sub>α</sub>-N<sub>ε</sub>-dicarbobenzoxyl lysyl, prolyl, prolyl, glycyL, glycyL, glycyL, prolyl, phényl-alanyl, N<sub>ε</sub> tosyl lysinate de méthyle :



L'ester pentapeptidique obtenu par hydrogénolyse de 4,3 g (5,4 mM) de (XXV), pendant 12 heures, dans 300 cm<sup>3</sup> de méthanol-diméthylformamide (5/1), est traité avec 3,59 g de Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-OH (5,4 mM) par 1,11 g de DCCI suivant la méthode B<sub>2</sub> dans 60 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile-diméthylformamide (5/1) pendant 48 heures à 0°, puis 24 heures à température ordinaire.

Le produit devient pulvérulent dans l'éther anhydre; précipité par l'éther de sa solution méthanolique.

- Poids obtenu = 6,22 g      Rendement = 87 %

-  $(\alpha)_D^{18} = -44^\circ, 1$  (c = 1 ; méthanol)

- Par chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore): Rf<sub>1</sub> = 0,05 ; Rf<sub>4</sub> = 0,05 ; Rf<sub>6</sub> = 0,62

- Analyse : C<sub>66</sub>H<sub>85</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>S, 3 H<sub>2</sub>O

Calc. % : C = 57,68      H = 6,67      N = 11,22

Tr. :      57,47      6,81      11,16

N . N<sub>ε</sub> dicarbobenzoxy lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. phénylalanyl. N<sub>ε</sub> tosyl lysine :



La saponification de 5,08 g (3,85 mM) de l'ester méthylique XXVI suivant la méthode générale donne un produit gommeux, lavé à l'eau froide, devenant pulvérulent par séchage sur CaCl<sub>2</sub>

- Poids obtenu : 4,28 g      Rendement : 83 %

Dans le filtrat aqueux, on récupère, par extraction à l'acétate d'éthyle, séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation, un résidu de 70 mg du même produit, ce qui porte le rendement à 86 %.

-  $(\alpha)_D^{18} = -62,2^\circ$  (c = 1 ; méthanol)

- par chromatographie sur couche mince (révélation par le chlore) : Rf<sub>6</sub> = 0,50 ; Rf<sub>1</sub> = 0 ; Rf<sub>2</sub> = 0

- Analyse : C<sub>65</sub>H<sub>83</sub>N<sub>11</sub>S, 2 H<sub>2</sub>O

Calc. % : C = 58,17 %      H = 6,68 %      N = 11,48 %

Tr. :      58,02      6,70      11,11

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. phénylalanyl. lysine :

Lys-Pro-Pro-Gly-Gly-Gly-Pro-Phe-Lys (peptide C)

0,980 g (0,74 mM) d'acide nonapeptidique XXVII traités par Na dans NH<sub>3</sub> liquide (méthode 2), ont donné, après dessalification, 700 mg de produit brut; après purification sur Sephadex, nous avons obtenu 247 mg de produit homogène (Rendement 33 %).

-  $(\alpha)_D^{18} = -88,7^\circ$  (C = 0,4 ; H<sub>2</sub>O)

- Chromatographie sur couche mince (révélation par la ninhydrine): Rf<sub>11</sub> = 0,16 ; Rf<sub>12</sub> = 0,10 ; Rf<sub>13</sub> = 0,35

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine : 0,66 (pH 1,9) ; 0,74 (pH 2,3) ; 0,47 (pH 8,6)

- Analyse :  $C_{42}H_{65}O_{10}N_{11}$  , 2  $CH_3COOH$  , 2  $H_2O$

Calc. % : C = 53,11    H = 7,46    N = 14,81

Tr. :            53,03            7,49            14,55

- Proportions relatives d'acides aminés :

|         | Lys  | Pro  | Gly  | Phe  |
|---------|------|------|------|------|
| Calc. : | 2    | 3    | 3    | 1    |
| Tr. :   | 2,00 | 2,72 | 2,72 | 0,88 |

Lysyl. prolylprolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. phénylalanyl. N $\epsilon$  tosyl lysine :



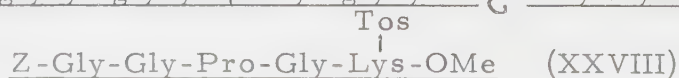
100 mg (0,07 mM) d'acide peptidique (XXVII) hydrogénés 8 heures dans 10 cm<sup>3</sup> de méthanol-eau (1/1) ont donné 47,3 mg (57 %) de produit pulvérulent, après évaporation du solvant et malaxage dans l'éther anhydre.

- Chromatographie sur couche mince (révélation par la ninhydrine) : une tache principale de  $Rf_{11} = 0,57$  ;  $Rf_{12} = 0,32$  ;  $Rf_{13} = 0,60$  et 1 tache faible de  $Rf$  légèrement supérieurs.

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine : 0,60 (pH 2,3).

## VI - PEPTIDE D

N. carbobenzoxy. glycyl. glycyl. prolyl. glycyl. N $\epsilon$  tosyl. lysinate de méthyle :



L'hydrogénation de 6,30 g (10,4 mM) de Z-Pro-Gly-Lys(Tos)-OMe pendant

3 heures dans 180 cm<sup>3</sup> de méthanol donne l'ester tripeptidique qui est traité avec 2,75 g de Z-Gly-Gly-OH (10,4 mM) par 2,14 g (10,4 mM) de DCCI dans 40 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile et 15 cm<sup>3</sup> de diméthylformamide suivant la méthode B2.

Par malaxage plusieurs fois dans l'éther anhydre et séchage sur CaCl<sub>2</sub>, on obtient un produit blanc, pulvérulent, sans point de fusion déterminé.

- Poids = 6,50 g                      Rendement = 87 %

-  $(\alpha)_D^{17} = -24^{\circ}4$  (c = 1 ; méthanol)

- Par chromatographie sur couche mince (révélation au chlore):

Rf<sub>1</sub> = 0,08

- Analyse : C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>S, H<sub>2</sub>O

Calc. % : C = 54,87              H = 6,42              N = 11,63

Tr. :              54,90              6,31              11,58

N<sub>2</sub>N<sub>2</sub> dicarbobenzoxyl lysyl. prolyl. prolyl. glycyL. glycyL. glycyL. prolyl. glycyL.

N<sub>2</sub> tosyl lysinate de méthyle :



5,79 g (8,1 mM) du dérivé XXVIII sont hydrogénés 9 heures dans 150 cm<sup>3</sup> de méthanol pour donner l'ester pentapeptidique qui est traité avec 5,38 g de Z-Lys(Z)-Pro-Pro-Gly-OH (8,1 mM) par 1,675 g de DCCI suivant la méthode B<sub>2</sub>, dans 150 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile-diméthylformamide (5/1), pendant 48 heures à 0°, et 24 heures à température ordinaire. Par malaxage dans l'éther on obtient 6,01 g d'un produit blanc pulvérulent (Rendement 60 %); purification par précipitation de la solution méthanolique par l'éther.

-Poids = 5,32 g                      Rendement = 53 %

-  $(\alpha)_D^{20} = -36^{\circ}6$  (c = 1 ; DMF)

-Par chromatographie sur couche mince de gel G F<sub>254</sub>

(révélation en UV et au chlore)  $Rf_1 = 0,04$  ;  $Rf_6 = 0,35$

- Analyse :  $C_{59}H_{79}N_{11}O_{16}S, H_2O$

Calc. % : C = 56,78      H = 6,54      N = 12,35

Tr. : 56,73      6,58      12,11

N<sub>8</sub> dicarbobenzoxy lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. glycyl.

N<sub>8</sub> tosyl. lysine :



La saponification de 3,806 g (3,1 mM) de l'ester XXIX suivant la méthode générale donne un précipité huileux qui est décanté, lavé deux fois à l'eau froide et séché sur  $CaCl_2$ , repris par l'éther anhydre pour donner un produit pulvérulent finalement filtré et séché sous vide.

- Poids = 3,291 g      Rendement = 85 %

-  $(\alpha)_D^{20} = -62^\circ$  (c = 1 ; méthanol)

- Par chromatographie sur couche mince, gel G F<sub>254</sub> (révélation en UV et par le chlore)  $Rf_6 = 0,31$

- Analyse :  $C_{58}H_{77}O_{16}N_{11}S, 2 H_2O$

Calc. % : C = 55,64      H = 6,52      N = 12,29

Tr. : 55,82      6,37      12,04

Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl. prolyl. glycyl. lysine :

Lys-Pro-Pro-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys (peptide D)

500 mg (0,41 mM) d'acide nonapeptidique (XXX), traités suivant la méthode 1, par Na dans  $NH_3$  liquide, ont donné, après dessalification, 380 mg de produit brut. Deux nouveaux passages sur Sephadex n'ont pas permis d'obtenir une fraction homogène par chromatographie sur couche mince.

L'opération, reprise sur 1,59 g (1,3 mM) d'acide XXX, suivant la méthode 2, nous a donné 1,01 g de produit brut, révélant un produit principal et 2 produits secondaires par chromatographie. Deux passages sur Sephadex ont permis d'isoler 380 mg de produit principal de réaction (Rendement 32 %).

$$- (\alpha)_D^{20} = -103,7 \quad (c = 0,5 ; H_2O)$$

- Chromatographie sur couche mince (révélation par la ninhydrine):

$$Rf_{11} = 0,05 ; Rf_{12} = 0,05 ; Rf_{13} = 0,20$$

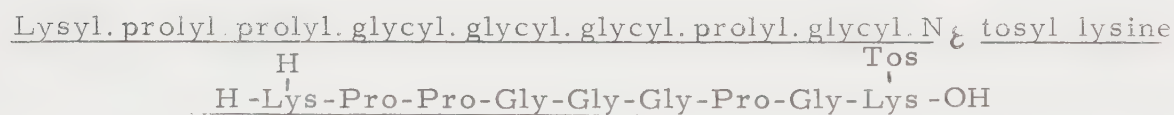
- Migration électrophorétique par rapport à la lysine : 0,68 (pH 1,9) 0,84 (pH 2,3) ; 0,47 (pH 8,6)

- Analyse :  $C_{35}H_{59}O_{10}N_{11}$ ,  $2 CH_3COOH$ ,  $4H_2O$

$$\text{Calc. \% : C} = 47,50 \quad H = 7,66 \quad N = 15,62$$

$$\text{Tr. : } 47,39 \quad 7,73 \quad 15,60$$

- Proportions relatives d'acides aminés: Lys 2,00; Pro 2,84; Gly 3,66



208 mg (0,17 mM) d'acide peptidique (XXX) ont été hydrogénés dans 20 cm<sup>3</sup> de méthanol-eau-acide acétique (10/9/1); le produit obtenu après évaporation du solvant étant hétérogène à l'électrophorèse, nous avons tenté la purification, sans succès, par passage sur colonne de Sephadex et précipitation de la solution méthanolique par l'éther ; finalement, 83 mg ont été purifiés par électrophorèse préparative sur papier MN 240 à pH 1,9 :

- Poids obtenu = 72 mg

- Chromatographie sur couche mince: homogène,  $Rf_{11} = 0,45$  ;

$$Rf_{12} = 0,25 ; Rf_{13} = 0,54$$

- Migration électrophorétique par rapport à la lysine: 0,60 (pH 2,3)

## CONCLUSION

Notre travail a été consacré à la synthèse de quatre analogues structuraux de la bradykinine, dans lesquels les deux arginines terminales sont remplacées par la lysine :

- (A) : Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Lys
- (B) : Lys-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Gly-Lys
- (C) : Lys-Pro-Pro-Gly-Gly-Gly-Pro-Phe-Lys
- (D) : Lys-Pro-Pro-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys

Nous avons d'abord passé en revue les principaux résultats relatifs aux rapports entre structure et activité des peptides, étudiés à l'aide d'analogues structuraux synthétiques, ainsi que les méthodes actuellement utilisées pour la synthèse des peptides.

Nous avons choisi la protection des groupements  $\alpha$ -aminés, ainsi que celui  $\epsilon$ -aminé de la lysine en 1, par le groupement carbobenzoxycarboxy, celle du groupement  $\epsilon$ -aminé de la lysine en 9 par le groupement tosyl.

Pour les couplages, des considérations de racémisation et de rendements, nous ont fait retenir la méthode des esters paranitrophényliques, pour l'addition d'un seul amino acide, celle de SHEEHAN pour la condensation de segments peptidiques lorsqu'il n'y avait pas de risque de racémisation, et la méthode de CURTIUS dans le cas contraire (activation du carboxyle de la sérine).

La décarbобенzoxylation des peptides intermédiaires a été réalisée par hydrogénolyse et la libération des peptides terminaux par action du sodium dans l'ammoniac liquide ; cette opération, conduite en milieu aprotique, donne des résultats corrects, malgré la présence d'enchaînements de la proline particulièrement sensibles.

L'emploi de Sephadex G. 10 nous a permis une dessalification facile des produits terminaux, puis l'obtention de fractions peptidiques homogènes, mais non une récupération totale du produit pur ; le temps nous ayant manqué pour mettre au point une technique de séparation plus efficace des impuretés.

Au cours de ce travail, nous avons montré :

- Que les esters p.nitrophényliques d'aminoacides N-protégés pouvaient être couplés avec un amino acide ou un peptide à fonction acide libre, en présence de base tertiaire, plus facilement qu'en présence de soude.
- Que la scission du tripeptide prolyl. prolyl. glycine, au cours de l'hydrogénolyse du dérivé N-carbобенzoxy et de la cristallisation du peptide, peut être évitée par l'emploi d'acide acétique pur comme solvant d'hydrogénolyse, et cristallisation du tripeptide à froid par l'éther anhydre.

Nous avons d'autre part observé les particularités suivantes :

- Le couplage de l'ester p.nitrophénylique de N-carbобенzoxy proline avec la prolyl. glycine n'a lieu qu'avec des rendements faibles, quelles que soient les conditions expérimentales.
- Au cours de la synthèse des deux dérivés tripeptidiques C-terminaux, par la méthode des esters p.nitrophényliques, la cyclisation de l'ester dipeptidique conduit à des produits secondaires ; la cyclo-phénylalanyl. N $\epsilon$ -tosyl lysine a été éliminée facilement, alors que la cyclo-glycyl. N $\epsilon$  tosyl lysine

n'a pu être séparée du dérivé tripeptidique.

-Le couplage de l'azide de N-carbobenzoxy phénylalanyl.sérine , avec le tripeptide C-terminal à fonction acide libre prolyl.phénylalanyl.N  $\epsilon$  -tosyl lysine, n'a pu être réalisé dans de bonnes conditions, alors qu'avec son ester méthylique, il a lieu avec un rendement acceptable

L'activité physiologique des peptides B, C et D n'a pu être encore déterminée, mais celle de la 1,9-lysine-bradykinine, synthétisée indépendamment par SCHRÖDER et WÜNSCH s'est révélée plus de 1000 fois inférieure à celle de la bradykinine sur l'utérus de rat et l'iléon de cobaye, et 500 fois inférieure sur la pression sanguine du lapin.

# BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. FISCHER, Ber., 1906, 39, 530
- (2) R.L.M. SYNGE, Quart.Rev., 1949, 3, 245
- (3) International Union of Pure and Applied Chemistry  
J. Biol.Chem., 1962, 237, 1381
- (4) R. SCHWYZER, J. RUDINGER, E. WUNSCH et G.T. YOUNG, Peptides  
proceedings of the 5<sup>th</sup> European Symposium (G.T. YOUNG 1963), p.261
- (5) A.H. LIVERMORE et V. DU VIGNEAUD, J. Biol.Chem., 1949, 80, 365
- (6) V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER, J.M. SWAN, C.W. ROBERTS et  
P.G. KATSOYANNIS, J. am.chem.Soc., 1953, 75, 4879
- (7) R.A. TURNER, J.G. PIERCE et V. DU VIGNEAUD, J. Biol.Chem. 1951,  
191, 21
- (8) E.A. POPENOE, H.C. LAWLER et V. DU VIGNEAUD, J. am.chem.Soc.  
1952, 74, 3713
- (9) B. BERDE, Pharmacologie des hormones neurohypophysaires et leurs  
analogues synthétiques (MASSON 1963)
- (10) R. ACHER, J. CHAUVET, M.T. LEUCI, F. MOREL et J. MAETZ ,  
Biochem.biophys. Acta, 1960, 42, 379
- (11) R. ACHER, J. CHAUVET, M.T. CHAUVET et D. CREPY, Biochem.  
biophys. Acta., 1965, 107, 393
- (12) R.A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, B. BERDE et H. KONZETT,  
Experientia, 1961, 17, 377
- (13) D. JARVIS et V. DU VIGNEAUD, Science, 1964, 143, 545
- (14) R. WALTER et V. DU VIGNEAUD, J. am.chem.Soc., 1966, 88, 1331
- (15) C.H. LI, Science, 1959, 129, 969
- (16) J.I. HARRIS et A.B. LERNER, Nature, 1957, 179, 1346
- (17) C.H. LI, Adv. Prot.Chem. 1957, 12, 269
- (18) J.P. WALLER et H.B.F. DIXON, Biochem.J., 1960, 75, 320
- (19) K. HOFMANN, T.Y. LIU, H. YAJIMA, N. YANAIHARA, C. YANAIHARA  
et J.L. HUMES, J. am.chem.Soc., 1962, 84, 1054

- (20) K. HANO, M. KOIDA, K. KUBO et H. YAJIMA, *Biochem.biophys. Acta*, 1964, 90, 201
- (21) H. GREGORY, P.M. HARDY, D.S. JONES, K.W. KENNER et R.C. SHEPPARD, *Nature*, 1964, 204, 931
- (22) R. SCHWYZER, *Annu.Rev. Biochem.*, 1964, 33, 259
- (23) M. ROCHA e SILVA, W.T. BERALDO et G. ROSENFELD, *Am.J.Physiol.* 1949, 156, 261
- (24) D.F. ELLIOTT, G.P. LEWIS et E.W. HORTON, *Biochem.J.*, 1960, 76, 16P
- (25) D.F. ELLIOTT, E.W. HORTON et G.P. LEWIS, *Biochem.J.*, 1961, 78, 60
- (26) R.A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P.A. JAQUENOUD, H. KONZETT et E. STÜRMER, *Experientia*, 1960, 16, 326
- (27) D.F. ELLIOTT, J.P. LEWIS et E.W. HORTON, *J.Physiol.*, 1960, 153, 473
- (28) R. JACQUES et R. MEIER, *Experientia*, 1960, 16, 371
- (29) E. SCHRÖDER et R. HEMPEL, *Experientia*, 1964, 20, 529
- (30) A. CERLETTI, E. STÜRMER et H. KONZETT, *Dtsch.med.Wschr.*, 1961, 86, 678
- (31) J.P. LEWIS, *Nature*, 1960, 188, 999
- (32) K.D. BHODA, H.O. COLLIER, M. SCHACHTER et P.G. SHORLEY, *Brit.J.Pharmacol.*, 1962, 19, 190
- (33) P.G. SHORLEY et H.O.J. COLLIER, *Nature*, 1960, 83, 999
- (34a) E. WERLE, I. TRAUTSCHOLD et G. LEYSATH, *Hop .Seylers Z.*, 1961, 326, 174
- (34b) J.V. PIERCE et M.E. WEBSTER, *Biochem.biophy.Res.Comm.*, 1961, 5, 353
- (35) D.F. ELLIOTT, G.P. LEWIS et D.G. SMYTH, *Biochem.J.*, 1963, 87, 21P
- (36) St. GUTTMANN et R.A. BOISSONNAS, *Helv.chim.Acta*, 1961, 44, 1713
- (37) M. BODANSZKY, M.A. ONDETTI, B. RUBIN, J.J. PIALA, J. FRIED, J.T. SHEEHAN et C.A. BIRKHIMER, *Nature*, 1962, 194, 485
- (38) K. VOGLER, R.O. STUDER et W. LERGIER, *Helv.chim.Acta*, 1961, 44, 1495
- (39) M. BODANSZKY, J.T. SHEEHAN, M.A. ONDETTI et S. LANDE, *J.am.chem.Soc.*, 1963, 85, 991
- (40) E. SCHRÖDER, *Ann.Chem.*, 1964, 679, 207

- (41) E.D. NICOLAIDES, M.K. CRAFT et H.A. DE WALD, *J.med.Chem.*, 1963, 6, 524
- (42) J.M. STEWART et D.W. WOOLLEY, *Nature*, 1965, 207, 1160
- (43) V. ERSPAMER et A. ANASTASI, *Experientia*, 1962, 18, 58
- (44) V.ERSPAMER, A. ANASTASI, G. BERTACCINI et J.M. CEI , *Experientia*, 1964, 20, 489
- (45) B. CAMERINO, G. DE CARO, R.A. BOISSONNAS, E.SANDRIN et E. STÜRMER, *Experientia*, 1963, 19, 339
- (46) T. CURTIUS, *J.prakt.Chem.*, 1882, 26, 175
- (47) E. FISCHER et E. FORNEAU, *Ber.*, 1901, 34, 2868
- (48) M. BERGMANN et L. ZEVAS, *Ber.*, 1932, 65, 1192
- (49) P.G. KATSOYANNIS, A. TOMETSKO et C. ZALUT, *J.am.Chem.Soc.*1966 88, 166
- (50) J.P. GREENSTEIN et M. WINITZ, *Chemistry of the aminoacides*, (J. WILEY, 1961), volume 2, chapitre 10
- (51) E. BRICAS, *Bull.Soc.chim.*, 1961, p.2015
- (52) T. WIELAND et H. DETERMANN, *Angew.Chem.(inter.ed.)*, 1963, 2, 358
- (53) E. SCHRÖDER et K. LUBKE, *The Peptides*(Academic Press 1965). Tome I
- (54) A. NEUBERGER, *Adv.Prot.Chem.*, 1948, 4, 297
- (55) H. KIENHNIS et A. WARWEIJ, *Rec.trav.chim.Pays-Bas*, 1964, 83, 223
- (56) H. FELTKAMP et H. PFROMMER, *J.Chromatog.*, 1965, 18 , 403
- (57) F. WEYGAND, A. PROX et W. KÖNIG, *Angew.Chem.(int.Ed.)*, 1963, 2, 183
- (58) M. BRENNER et H.C. CURTIUS, *Helv.chim.Acta*, 1963, 26, 2167
- (59) R.H. SIFFERD et V. DU VIGNEAUD, *J.biol.Chem.*, 1935, 108, 753
- (60) R. SCHWYZER, P. SIEBER et K. ZATSKO, *Helv.chim.Acta*, 1958, 41, 491
- (61) F.C. Mc KAY et N.F. ALBERTSON, *J.am.chem.Soc.*, 1957, 79, 4686
- (62) R. SCHWYZER, P. SIEBER et H. KAPPELER, *Helv.chim.Acta*, 1959, 42, 2622
- (63) G. LOSS, H. JESCHKEIT et E. WILLENBERG, *Angew.Chem.* 1964, 76, 271
- (64) A. HAJOS, *Ber.*, 1961, 94, 2350
- (65) J. GRIMSHAW, *J. Chem.Soc.*, 1965, p.7136

- (66) P. LEFRANCIER et E. BRICAS, Bull.Soc.chim., 1965, p. 3668
- (67) E. FISCHER, Ber., 1915, 48, 93
- (68) V. DU VIGNEAUD et O.K. BEHRENS, J.Biol.Chem., 1936, 117, 27
- (69) J. KOVACS et U.R. GHATAK, J.Org.Chem., 1966, 31, 119
- (70) K. HOFMANN et H. YAJMA, J.am.chem.Soc., 1961, 83, 2289
- (71) St- GUTTMANN, Peptides Proceedings of the 5<sup>th</sup> European Symposium  
(G.T. YOUNG 1963), p.41
- (72) M. WILCHEK, S. SARID et A. PATCHORNIK, Biochem.biophys.Acta,  
1965, 104, 616
- (73) J. RAMACHANDRAN, D. CHUNG et C.H. LI, J.am.chem.Soc., 1965, 87,  
2696
- (74) J.C. SHEEHAN et V.J. GREINDA, J.am.chem.Soc., 1962, 84, 2417
- (75) B. HALPERN et L.B. JAMES, Nature, 1964, 202, 592
- (76) J.MEINHOFER, Nature, 1965, 205, 73
- (77) R.G. HISKEY et J.B. ADAMS, J.am.chem.Soc., 1965, 87, 3969
- (78) G.H.L. NEFKENS, G.I. TESSER et R.J.F. NIVARD, Rec.Trav.chim.  
Pays-Bas, 1963, 82, 941
- (79) L. BIRKOFER, W. KONKOL et A. RITTER, Ber., 1961, 94, 1263
- (80) M. FRANKEL, D. GERTNER, D. WAGNER et A. ZILKHA, J.org.Chem.  
1965, 30, 1596
- (81) R.B. MERRIFIELD, Endeavour, 1965, 24, 91
- (82) R.B. MERRIFIELD et J.M. STEWART, Nature, 1965, 207, 522
- (83) T. CURTIUS, Ber., 1903, 36, 2106
- (84) H.T. CHEUNG et E.R. BLANT, J.org.Chem., 1965, 30, 315
- (85) J.S. FRUTON, J. biol.Chem., 1942, 146, 463
- (86) T. WIELAND, W. SCHÄFER et E. BOKELMANN, Ann.Chem., 1951, 573,  
99
- (87) R. SCHWYZER, B. ISELIN et M. FEURER, Helv. chim. Acta, 1955, 38, 69
- (88) M. BODANSZKY, Nature, 1955, 175, 685
- (89) K. NORWAK et I. SIEMON, Roczn.Chem., 1963, 37, 693
- (90) H.D. LAW, J.chem.Soc., 1965, p.3897
- (91) J. PLESS et R.A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta, 1963, 46, 1609

- (92) H.C. BEYERMAN et W.M. VAN DEN BRINK, *Proc.chem.Soc.*, 1963, p.266
- (93) G.W. ANDERSON, J.E. SIMMERMAN et F.C. CALLAHAN, *J.am.chem.Soc.*, 1964, 86, 1839
- (94) B.O. HANDFORD, J.H. JONES, G.T. YOUNG et T.F.N. JOHNSON, *J.chem.Soc.*, 1965, p.6814
- (95) L.A. PAQUETTE, *J.am.chem.Soc.*, 1965, 87, 5186
- (96) J.C. SHEEHAN et G.P. HESS, *J.am.chem.Soc.*, 1955, 77, 1067
- (97) J.C. SHEEHAN, J. PRESTON et P.A. CRUICKSHAND, *J.am.chem.Soc.*, 1965, 87, 2492
- (98) A.S. VAN MOURIK, E. HARRYVAN et J.F. ARENS, *Rec.Trav.chim.Pays-Bas*, 1965, 84, 1344
- (99) R.B. WOODWARD, R.A. OLOFSON et H. MAYER, *J.am.chem.Soc.*, 1961, 83, 1010
- (100) R. PAUL et G.W. ANDERSON, *J.org.Chem.*, 1962, 27, 2094
- (101) S. GOLDSCHMIDT et H. LAUTENSCHLAGER, *Ann.Chem.*, 1953, 580, 68
- (102) E.D. NICOLAIDES, H.A. DE WALD et M.K. CRAFT, *J.med.Chem.*, 1963, 6, 737
- (103) E. SCHRÖDER, *Ann.Chem.*, 1964, 673, 220
- (104) E. WÜNSCH, H.G. HEIDRICH et W. GRASSMANN, *Ber.*, 1964, 97, 1818
- (105) H.A. DE WALD, *J.med.Chem.*, 1964, 7, 50
- (106) M.F. PERUTZ, *Nature*, 1962, 194, 914
- (107) R. WEBER, *Helv.chim.Acta*, 1963, 26, 2046
- (108) M. BODANSZKY et V. DU VIGNEAUD, *J.am.chem.Soc.*, 1959, 81, 5689
- (109) E. D. NICOLAIDES et H. A. DE WALD, *J.org.Chem.*, 1961, 26, 3872
- (110) St. GUTTMANN, J. PLESS et R.A. BOISSONNAS, *Helv.chim.Acta*, 1962 45, 170
- (111) I. Z. SIEMON, *Roczn. Chem.*, 1964, 38, 133
- (112) M. GOODMAN et K.C. STUEBEN, *J.org.Chem.*, 1959, 24, 112
- (113) E.P. GROMMERS et J.F. ARENS, *Rec.Trav.chim.Pays-Bas*, 1959, 78,
- (114) H.E. CARTER, R.L. FRANK, H.W. JOHNSTON, N.L. DRAKE, et <sup>558</sup>  
C.M. EAKER, *Org.Synth.*, 1943, 23, 13

- (115) R. ROESKE, F.H.C. STEWART, R.J. STEDMAN et V. DU VIGNEAUD, J.am.chem.Soc., 1956, 78, 5884
- (116) R. MONNIER, et M. JUTISZ, Biochem.biophys.Acta, 1954, 14, 55
- (117) H.N. RYDON et C.S. SMITH Nature, 1952, 169, 917
- (118) J.C. BARETT, Nature, 1962, 194, 1171
- (119) P.A. JAQUENOUD, Chimia, 1960, 14, 373
- (120) R.A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN et P.A. JAQUENOUD, Helv.Chim. Acta, 1960, 43, 1481
- (121) E. WÜNSCH, Peptides Proceedings of the 5<sup>th</sup> European Symposium (G.T. YOUNG 1963), p.89
- (122) J. PORATH, Biochem.Biophys.Acta, 1960, 39, 193
- (123) C. SANNIE, Bull.Soc.chim., 1942, 9, 487
- (124) E. FISCHER, Ber., 1903, 36, 2982
- (125) W. GRASSMANN, E. WÜNSCH et A. RIEDEL, Ber., 1958, 91, 455
- (126) A. BERGER, J. KURTZ et E. KATCHALSKI, J.am.chem.Soc. 1954, 76, 5552
- (127) E. SCHRÖDER, K. KLIEGER et H. GIBIAN, Ann.Chem., 1961, 646, 101
- (128) R.A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, R.L. HUGUENIN, P.A. JAQUENOUD et E. SANDRIN, Helv.chim.Acta, 1958, 41, 1867
- (129) R.W. CHAMBERS et F.H. CARPENTER, J.am.chem.Soc., 1955, 77, 1522
- (130) R. SCHWYZER et P. SIEBER, Helv.chim.Acta, 1958, 41, 1582
- (131) D.F. ELLIOTT et D.W. RUSSEL, Biochem.J., 1957, 66, 49P
- (132) M. GOODMAN et K.C. STUEBEN, J.am.chem.Soc., 1959, 81;3982
- (133) M. BODANSZKY et V. DU VIGNEAUD, J.am.chem.Soc., 1959, 81, 6073
- (134) M. BODANSZKY, V. DU VIGNEAUD, J.A. ROTHFUS et E.L. SMITH, Biochem.Prep., 1962, 9, 110
- (135) C. SCHATTKERK, G.H. VISSER, K.E.T. KERLING et E. HAVINGA, Rec.Trav.chim.Pays-Bas, 1964, 83, 677
- (136) J. PLESS, E. STÜRMER, St. GUTTMANN et R.A. BOISSONNAS, Helv.chim.Acta, 1962, 45, 394
- (137) W. GRASSMANN et E. WÜNSCH, Ber., 1958, 91, 449
- (138) S. LAUDE, J.org.Chem., 1962, 27, 4558

- (139) R. SCHUTZ et A.C. KIURICK, Chem.Engng.News, 1963, 41, 52
- (140) R.A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN et P.A. JAQUENOUD, Helv.chim.  
Acta, 1960, 43, 1349
- (141) E. SCHRÖDER et H. GIBIAN, Ann.Chem., 1964, 673, 186
- (142) E. FISCHER, Ber., 1906, 39, 2893
- (143) M. BERGMANN, L. ZERVAS et J.S. FRUTON, J.Biol.Chem., 1935,  
III, 225
- (144) H.N. RYDON, W.G. SMITH, J. chem.Soc., 1956, p. 3642

## TABLE DES MATIERES

page :

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                                                            | 1  |
| CHAPITRE I : ANALOGUES STRUCTURAUX DES PEPTIDES<br>NATURELS ACTIFS.<br>RAPPORTS STRUCTURE-ACTIVITE .          |    |
| I- Réalisation d'analogues structuraux des peptides naturels..                                                | 6  |
| II - Peptides hormonaux .....                                                                                 | 9  |
| III - Bradykinine et autres peptides vasoactifs.....                                                          | 13 |
| Conclusion .....                                                                                              | 19 |
| CHAPITRE II : METHODES DE SYNTHESE PEPTIDIQUE                                                                 |    |
| I - Historique .....                                                                                          | 21 |
| II - Schéma de la synthèse peptidique .....                                                                   | 23 |
| III- Conditions générales relatives aux opérations de synthèse..                                              | 24 |
| IV- Protection de la fonction amine .....                                                                     | 29 |
| V - Protection de la fonction acide .....                                                                     | 36 |
| VI- Méthodes de couplage .....                                                                                | 40 |
| CHAPITRE III : SCHEMAS DE SYNTHESE, PARTIE THEORIQUE                                                          |    |
| Introduction .....                                                                                            | 51 |
| I - Construction des chaînes et couplages.....                                                                | 53 |
| II - Protection des groupements aminés .....                                                                  | 54 |
| III- Protection des groupements carboxyliques .....                                                           | 55 |
| IV- Contrôle de l'homogénéité des produits obtenus .....                                                      | 56 |
| V - Peptide A : Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalananyl. séryl.<br>prolyl. phénylalananyl. lysine. .... | 58 |
| VI- Peptide B : Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. phénylalananyl. séryl.<br>prolyl. glycyl. lysine. ....         | 68 |
| VII- Peptide C : Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl.<br>prolyl. phénylalananyl. lysine.....        | 70 |
| VIII- Peptide D : Lysyl. prolyl. prolyl. glycyl. glycyl. glycyl.<br>prolyl. glycyl. lysine .....              | 72 |

## CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| I - Dérivés d'amino acides .....  | 76  |
| II - Méthodes générales .....     | 79  |
| III - Synthèse du peptide A ..... | 86  |
| IV - Synthèse du peptide B .....  | 100 |
| V - Synthèse du peptide C .....   | 105 |
| VI - Synthèse du peptide D .....  | 112 |
| CONCLUSION .....                  | 116 |
| INDEX BIBLIOGRAPHIQUE .....       | 119 |



DEUXIEME THESE

-----

Propositions données par la Faculté

" Application de la résonnance paramagnétique  
électronique à l'étude des radicaux libres "

Vu :

Les Membres du Jury,

MM. COLONGE Président

CHOPIN )

MICHEL : Examineurs

BRICAS

Vu et approuvé

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer

Lyon, le 18 Juin 1966

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS









